

Том 11, № 4. С. 601–800

ISSN 2220-7619 (print)  
ISSN 2313-7398 (online)

2021

ИНФЕКЦИЯ

И

ИММУНИТЕТ



# ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

июль–август

2021, том 11

№ 4

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

## Главный редактор

**Тотоян Арег А.** д.м.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

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

**Типография ООО «Аллегро»**  
196084, Санкт-Петербург,  
ул. Коли Томчака, 28.  
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 30.08.2021 г. Формат 60 x 90 1/8.  
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 25.  
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).  
Заказ № 1265

© 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)

July–August

2021, volume 11

No. 4

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

## Editor-in-chief

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

## Deputy editor-in-chief

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

## Members of editorial board

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

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

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

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

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

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

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

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

**Dmitry K. Lvov** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, 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
- Lidila 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](http://www.iimmun.ru) and [www.elibrary.ru](http://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](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

## Produced at the Allegro Printing House

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

© 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

Passed for printing 30.08.2021. Print format 60 x 90 1/8.

Offset printing. Printed sheets 25.

Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies).

# СОДЕРЖАНИЕ

## Передовая статья

Попова А.Ю., Тотолян А.А.

<b>МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ COVID-19</b> .....	609
--	-----

## Обзоры

Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Саркисян Н.С., Волюнкина А.С.

<b>COVID-19 КАК ЗООНОЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ</b> .....	617
--	-----

Москвина Т.В., Щелканов М.Ю., Цыбульский А.В.

<b>FeLV-ИНФЕКЦИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ И ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗА КОШЕК</b> .....	624
---	-----

Васильев В.В., Рогозина Н.В., Гринева А.А.

<b>МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ВИРУСОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ВРОЖДЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ</b> .....	635
--	-----

Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Черешнев В.А.

<b>«СЕПСИС-3»: НОВАЯ РЕДАКЦИЯ – СТАРЫЕ ПРОБЛЕМЫ. АНАЛИЗ С ПОЗИЦИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ</b> .....	649
---	-----

## Оригинальные статьи

Масейкина А.А., Степаненко И.С., Ямашкин С.А., Слестников Е.Д.

<b>ВЛИЯНИЕ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 1Н-ИНДОЛ-4-, -5-, -6-, -7-ИЛАМИНОВ</b> .....	663
--	-----

Дьякова М.Е., Серебряная Н.Б., Кирюхина Л.Д., Эсмедляева Д.С., Яблонский П.К.

<b>АДЕНОЗИН-РЕГУЛИРУЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВЕНТИЛЯЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ</b> .....	671
--	-----

Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Чаплин А.В., Чагина И.А., Урбан Ю.Н., Максимова Н.М., Корженкова М.П., Афанасьев С.С., Кафарская Л.И., Афанасьев М.С., Крикун В.В., Якунина О.Ю.

<b>ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ <i>CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE</i>, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ</b> .....	683
---	-----

Личная Е.В., Фам Т.Х.Ж., Петрова О.А., Чан Т.Н., Нгуен Т.Т., Буй Т.Т.Н., Во В.К., Дмитриев А.В., Калинина О.В.

<b>РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕПАТИТА Е СРЕДИ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРНОЙ ПРОВИНЦИИ ХА ЗАНГ, ВЬЕТНАМ</b> .....	692
--	-----

Сорокин В.М., Сварваль А.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В.

<b>ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ШТАММОВ <i>HELICOBACTER PYLORI</i>, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РФ</b> .....	701
---	-----

Гнатив Б.Р., Токаревич Н.К.

<b>РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА КЛЕЩЕВОГО ВИРУСНОГО ЭНЦЕФАЛИТА И КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ</b> .....	707
--	-----

Курская О.Г., Аношина А.В., Леонова Н.В., Симкина О.А., Комиссарова Т.В., Есикова Е.Ю., Позднякова Л.Л., Соболев И.А., Прокопьева Е.А., Мурашкина Т.А., Казачкова Е.А., Алексеев А.Ю., Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б., Столяров К.А., Фадеев А.В., Соминина А.А., Шестопалов А.М., Шаршов К.А.

<b>ЭТИОЛОГИЯ ГРИППОПОДОБНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У НАСЕЛЕНИЯ НОВОСИБИРСКА ВО ВРЕМЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЕЗОНА 2018–2019 гг.</b> .....	723
---	-----

Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Несвижский Ю.В., Зверев В.В., Афанасьев С.С., Волчкова Е.В., Афанасьев М.С., Буданова Е.В., Бошьян Р.Е., Лиханская Е.И., Урбан Ю.Н., Сулейманова М.Э., Воропаева В.А., Филина Ю.С.

<b>СТРУКТУРА СООБЩЕСТВА ГРИБОВ РОДА <i>CANDIDA</i> В РОТОГЛОТКЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ</b> .....	737
--	-----

Кравченко Л.В.

**ПРОГНОЗ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ ..... 745**

Подколзин А.Т., Кожаметова Т.А., Кясова Д.Х., Далелова З.Х., Кулешов К.В., Гусева А.Н., Павлова А.С., Веселова О.А., Паркина Н.В., Коновалова Т.А., Яцышина С.Б.

**АССОЦИАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ДИАРЕЙ С ЛЕТАЛЬНЫМИ ИСХОДАМИ У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА ..... 752**

Калошин А.А., Зимина Е.М., Калининченко Е.О., Михайлова Н.А.

**ПОЛУЧЕНИЕ, ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПОДЛИННОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ ..... 763**

## Краткие сообщения

Гудкова Е.С., Удегова Е.С., Гильдеева К.А., Рукосуева Т.В., Съед Б.

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ ..... 771**

Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Гошина А.Д., Вишня А.А., Кудрявцев И.В., Сеницына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М.

**УСИЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ АНТИГЕНА НА МИКРО- И НАНОЧАСТИЦАХ ..... 777**

Воробьева О.В., Ласточкин А.В.

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ РАЗВИТИЯ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ, АССОЦИИРОВАННОГО С ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ, У МОЛОДОГО ПАЦИЕНТА ..... 784**

## В помощь практическому врачу

Валиева Р.И., Лисовская С.А., Маянская К.А., Самигуллин Д.В., Исаева Г.Ш.

**ОСОБЕННОСТИ АНТИФУНГАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ГРИБКОВОГО КЕРАТИТА И АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С УЧЕТОМ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНК ..... 789**

**Правила для авторов ..... 797**

**Авторский указатель ..... 800**

**Предметный указатель ..... 800**

# CONTENTS

## Lead article

*Popova A.Yu., Totolian A.A.*

<b>METHODOLOGY FOR ASSESSING HERD IMMUNITY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS IN THE CONTEXT OF THE COVID-19 PANDEMIC .....</b>	<b>609</b>
--	------------

## Reviews

*Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Sarkisyan N.S., Volynkina A.S.*

<b>COVID-19 AS A ZOOLOGICAL INFECTION .....</b>	<b>617</b>
---	------------

*Moskvina T.V., Shchelkanov M.Yu., Tsybulski A.V.*

<b>FeLV-INFECTION: PROBLEMS AND PROSPECTS OF VACCINE PREVENTION AND INTERFERON-THERAPY OF FELINE LEUKEMIA .....</b>	<b>624</b>
---	------------

*Vasilev V.V., Rogozina N.V., Grineva A.A.*

<b>MOLECULAR GENETIC AND CLINICAL ASPECTS OF SOCIALLY RELEVANT VIRUSES UNDERLYING CONGENITAL DISEASES .....</b>	<b>635</b>
---	------------

*Gusev E.Yu., Zotova N.V., Chereshnev V.A.*

<b>SEPSIS-3: NEW EDITION – OLD PROBLEMS. ANALYSIS FROM THE PERSPECTIVE OF GENERAL PATHOLOGY .....</b>	<b>649</b>
---	------------

## Original articles

*Maseykina A.A., Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Slastnikov E.D.*

<b>AN IMPACT OF 1H-INDOL-4-, -5-, -6-, -7-YLAMINES-SUBSTITUTED COMPOUNDS ON THE MICROBIAL CELL GENETIC APPARATUS .....</b>	<b>663</b>
--	------------

*Dyakova M.E., Serebryanaya N.B., Kiryukhina L.D., Esmedlyaeva D.S., Yablonskiy P.K.*

<b>ADENOSINE-REGULATED MECHANISMS IN THE PATHOGENESIS OF VENTILATION DISORDERS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS .....</b>	<b>671</b>
--	------------

*Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Chaplin A.V., Chagina I.A., Urban Y.N., Maksimova N.M., Korzhenskova M.P., Afanasiev S.S., Kafarskaya L.I., Afanasiev M.S., Krikun V.V., Yakunina O.Yu.*

<b>CHARACTERIZATION OF TOXIGENIC <i>CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE</i> STRAINS ISOLATED IN RUSSIA .....</b>	<b>683</b>
--	------------

*Lichnaia E.V., Pham T.H.G., Petrova O.A., Tran T.N., Nguyen T.T., Bui T.T.N., Vo V.C., Dmitriev A.V., Kalinina O.V.*

<b>HEPATITIS E VIRUS SEROPREVALENCE IN INDIGENOUS RESIDENTS OF THE HÀ GIANG NORTHERN PROVINCE OF VIETNAM .....</b>	<b>692</b>
--	------------

*Sorokin V.M., Svarval A.V., Vodop'janov A.S., Pisanov R.V.*

<b>GEOGRAPHICAL DIVERSITY OF <i>HELICOBACTER PYLORI</i> STRAINS CIRCULATING IN THE EUROPEAN PART OF THE RUSSIAN FEDERATION .....</b>	<b>701</b>
--	------------

*Gnativ B.R., Tokarevich N.K.*

<b>LONG-TERM MONITORING OF TICK-BORNE VIRAL ENCEPHALITIS AND TICK-BORNE BORRELIOSIS IN THE KOMI REPUBLIC .....</b>	<b>707</b>
--	------------

*Kurskaya O.G., Anoshina A.V., Leonova N.V., Simkina O.A., Komissarova T.V., Esikova E.Yu., Pozdnyakova L.L., Sobolev I.A., Prokopyeva E.A., Murashkina T.A., Kazachkova E.A., Alekseev A.Yu., Danilenko D.M., Komissarov A.B., Stolyarov K.A., Fadeev A.V., Sominina A.A., Shestopalov A.M., Sharshov K.A.*

<b>ETIOLOGY OF INFLUENZA-LIKE ILLNESSES IN THE POPULATION OF NOVOSIBIRSK CITY IN THE 2018–2019 EPIDEMIC SEASON .....</b>	<b>723</b>
--	------------

*Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Nesvizhsky Yu.V., Zverev V.V., Afanasiev S.S., Volchkova E.V., Afanasiev M.S., Budanova E.V., Boshjan R.E., Likhanskaya E.I., Urban Y.N., Suleymanova M.E., Voropaeva V.A., Filina Yu.S.*

<b>THE STRUCTURE OF THE OROPHARYNGEAL GENUS <i>CANDIDA</i> FUNGI COMMUNITY IN HIV-INFECTED PATIENTS .....</b>	<b>737</b>
---	------------

*Kravchenko L.V.*  
**PROGNOSIS OF SEVERE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN NEWBORNS** ..... 745

*Podkolzin A.T., Kozhakhmetova T.A., Kyasova D.Kh., Dalelova Z.Kh., Kuleshov K.V., Guseva A.N., Pavlova A.S., Veselova O.A., Parkina N.V., Konovalova T.A., Yatsyshina S.B.*  
**A RELATIONSHIP BETWEEN CAUSATIVE AGENTS OF INFECTIOUS DIARRHEA AND FATAL OUTCOMES IN PRE-SCHOOL CHILDREN** ..... 752

*Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A.*  
**GENERATION AND EVALUATION OF SPECIFIC ACTIVITY AND AUTHENTICITY OF RECOMBINANT VACCINE DESIGNED PREVENTING AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA** ..... 763

**Short communications**

*Gudkova E.S., Udegova E.S., Gildeeva K.A., Rukosueva T.V., Syed B.*  
**METAL NANOPARTICLE ANTIBACTERIAL EFFECT ON ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF BACTERIA**..... 771

*Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Goshina A.D., Vishnya A.A., Kudryavtsev I.V., Smitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M.*  
**ENHANCING THE SPECIFIC T CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST MICRO- AND NANOPARTICLE IMMOBILIZED ANTIGEN** ..... 777

*Vorobeva O.V., Lastochkin A.V.*  
**CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CASE OF DEVELOPING LIVER CIRRHOSIS ASSOCIATED WITH VIRAL HEPATITIS IN A YOUNG PATIENT** ..... 784

**For the practical physicians**

*Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G.Sh.*  
**FEATURES OF ANTIFUNGAL THERAPY DURING LONG-LASTING INFECTIOUS PROCESS: A CLINICAL CASE OF FUNGAL KERATITIS AND PROFILE OF ANTIFUNGAL SENSITIVITY BASED ON ASSESSING BIOFILM FORMATION** ..... 789

**Instructions to Authors** ..... 797

**Author index** ..... 800

**Subject index** ..... 800

Kravchenko L.V.

**PROGNOSIS OF SEVERE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN NEWBORNS ..... 745**

Podkolzin A.T., Kozhakhmetova T.A., Kyasova D.Kh., Dalelova Z.Kh., Kuleshov K.V., Guseva A.N., Pavlova A.S., Veselova O.A., Parkina N.V., Konovalova T.A., Yatsyshina S.B.

**A RELATIONSHIP BETWEEN CAUSATIVE AGENTS OF INFECTIOUS DIARRHEA AND FATAL OUTCOMES IN PRE-SCHOOL CHILDREN ..... 752**

Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A.

**GENERATION AND EVALUATION OF SPECIFIC ACTIVITY AND AUTHENTICITY OF RECOMBINANT VACCINE DESIGNED PREVENTING AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA ..... 763**

**Short communications**

Gudkova E.S., Udegova E.S., Gildeeva K.A., Rukosueva T.V., Syed B.

**METAL NANOPARTICLE ANTIBACTERIAL EFFECT ON ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF BACTERIA ..... 771**

Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Goshina A.D., Vishnya A.A., Kudryavtsev I.V., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M.

**ENHANCING THE SPECIFIC T CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST MICRO- AND NANOPARTICLE IMMOBILIZED ANTIGEN ..... 777**

Vorobeva O.V., Lastochkin A.V.

**CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CASE OF DEVELOPING LIVER CIRRHOSIS ASSOCIATED WITH VIRAL HEPATITIS IN A YOUNG PATIENT ..... 784**

**For the practical physicians**

Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G.Sh.

**FEATURES OF ANTIFUNGAL THERAPY DURING LONG-LASTING INFECTIOUS PROCESS: A CLINICAL CASE OF FUNGAL KERATITIS AND PROFILE OF ANTIFUNGAL SENSITIVITY BASED ON ASSESSING BIOFILM FORMATION ..... 789**

**Instructions to Authors ..... 797**

**Author index ..... 800**

**Subject index ..... 800**

# МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ COVID-19

А.Ю. Попова<sup>1</sup>, А.А. Тотолян<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Проведение серологического мониторинга с целью изучения популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии COVID-19 является необходимым элементом эпидемиологического надзора, поскольку эпидемиологическое благополучие населения в отношении COVID-19 определяется состоянием популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2. Коллективный иммунитет популяции является лимитирующим фактором в отношении распространения вируса SARS-CoV-2. Информация о состоянии популяционного иммунитета необходима для разработки прогноза развития эпидемиологической ситуации, а также планирования мероприятий по специфической и неспецифической профилактике COVID-19. В этой связи исследование популяционного иммунитета в период пандемии необходимо для прогноза развития эпидемии и выявления особенностей эпидемического процесса в отдельно взятом регионе и в стране в целом. В мае 2020 года была разработана программа Роспотребнадзора «Оценка популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения Российской Федерации в условиях пандемии COVID-19». Программа была составлена с учетом рекомендаций ВОЗ в формате продольного когортного исследования со стратификацией по возрасту. На первом этапе формируется когорта волонтеров, которая обследуется на втором и последующих этапах; число этапов зависит от эпидситуации. Помимо рандомизации по возрасту при формировании когорты на первом этапе соблюдался принцип равномерности охвата популяции, исключали участие волонтеров из одного учреждения, исключали использование донорской крови или крови пациентов медицинских организаций. Обследование проводили среди 7 возрастных групп здорового детского и взрослого населения вне зависимости от наличия или отсутствия перенесенного заболевания COVID-19. В связи с тем, что популяционное исследование проводится в условиях пандемии COVID-19, оптимальный срок сбора биоматериала на каждом из этапов составляет не более 5–7 дней. Анкетирование, отбор волонтеров, их запись на сдачу крови, а также обработка результатов на первом этапе и реализация второго и последующих этапов программы осуществляется только с помощью технологии облачного сервиса. Данная программа и технология ее реализации прошла успешную апробацию в 26 регионах Российской Федерации в ходе реализации четырех этапов с июня 2020 года по март 2021 года. Таким образом, в настоящее время Роспотребнадзором разработана методология и создана эффективно работающая система серологического мониторинга по оценке уровня популяционного иммунитета в разных регионах Российской Федерации для прогнозирования эпидситуации, выработки рекомендаций, планирования вакцинации.

**Ключевые слова:** коллективный иммунитет, COVID-19, SARS-CoV-2, антитела к SARS-CoV-2.

## Адрес для переписки:

Тотолян Арег Артемович  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.  
Тел.: 8 (812) 233-20-92.  
E-mail: totolian@pasteurorg.ru

## Contacts:

Areg A. Totolian  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 (812) 233-20-92.  
E-mail: totolian@pasteurorg.ru

## Для цитирования:

Попова А.Ю., Тотолян А.А. Методология оценки популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 609–616. doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770

## Citation:

Popova A.Yu., Totolian A.A. Methodology for assessing herd immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of the COVID-19 pandemic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 609–616. doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770

## METHODOLOGY FOR ASSESSING HERD IMMUNITY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS IN THE CONTEXT OF THE COVID-19 PANDEMIC

Popova A.Yu.<sup>a</sup>, Totolian A.A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Serological monitoring of the study of population immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of COVID-19 pandemic is a necessary component in epidemiological surveillance, since population epidemiological well-being in a context of COVID-19 is determined by state of population immunity to the SARS-CoV-2 virus. The population herd immunity is the limiting factor in spread of the SARS-CoV-2 virus. Information on the state of population immunity is necessary to make a forecast for development of epidemiological situation, as well as to plan measures for specific and non-specific prevention of COVID-19. In this regard, the study of population immunity during the pandemic is necessary to predict development of the epidemic and identify features of epidemic process in any certain region and in the country in general. In May 2020, the Rospotrebnadzor program "Assessment of population immunity to the SARS-CoV-2 virus in the population of the Russian Federation in the context of the COVID-19 pandemic" was developed taking into account WHO recommendations in the format of a longitudinal cohort study with age stratification: at the first stage, a cohort of volunteers is formed; at the second and subsequent stages, the cohort of volunteers formed at the first stage is subject to examination; the number of stages depends on the epidemiological situation. In addition to age-related randomization while forming a cohort, at the first stage, the principle of population coverage uniformity was observed, the participation of volunteers from one institution was excluded, and the use of donated blood or patient blood from medical organizations was excluded. The survey was carried out among 7 age groups of healthy children and adults, regardless present or absent previous COVID-19 disease. Due to the fact that the population study is carried out in the context of COVID-19 pandemic, the optimal timing for collecting biomaterial at each stage is no more than 5–7 days. Questioning, selection of volunteers, their registration for blood donation, as well as processing of the results at the first stage, as well as the implementation of the second and subsequent stages of the Program are carried out only by using cloud service technology. This Program and the technology for its implementation have been successfully tested in 26 regions of the Russian Federation during the implementation of four stages from June 2020 to March 2021. Thus, at present, Rospotrebnadzor has developed a methodology and created an effectively working system of serological monitoring to assess level of herd immunity in different regions of the Russian Federation to predict the epidemiological situation, develop recommendations, and plan vaccination.

**Key words:** herd immunity, COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies to SARS-CoV-2.

Проведение серологического мониторинга с целью изучения популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии COVID-19 является необходимым элементом эпидемиологического надзора, поскольку эпидемиологическое благополучие населения в отношении COVID-19 определяется состоянием популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 (рис. 1). Коллективный иммунитет популяции является лимитирующим фактором в отношении распространения вируса SARS-CoV-2.

Информация о состоянии популяционного иммунитета необходима для разработки прогноза развития эпидемиологической ситуации, а также планирования мероприятий по специфической и неспецифической профилактике COVID-19 (рис. 2).

В этой связи исследование популяционного иммунитета в период пандемии необходимо для прогноза развития эпидемии и выявления особенностей эпидемического процесса в отдельно взятом регионе и в стране в целом.

В мае 2020 года была разработана программа Роспотребнадзора «Оценка популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения Российской Федерации в условиях пандемии

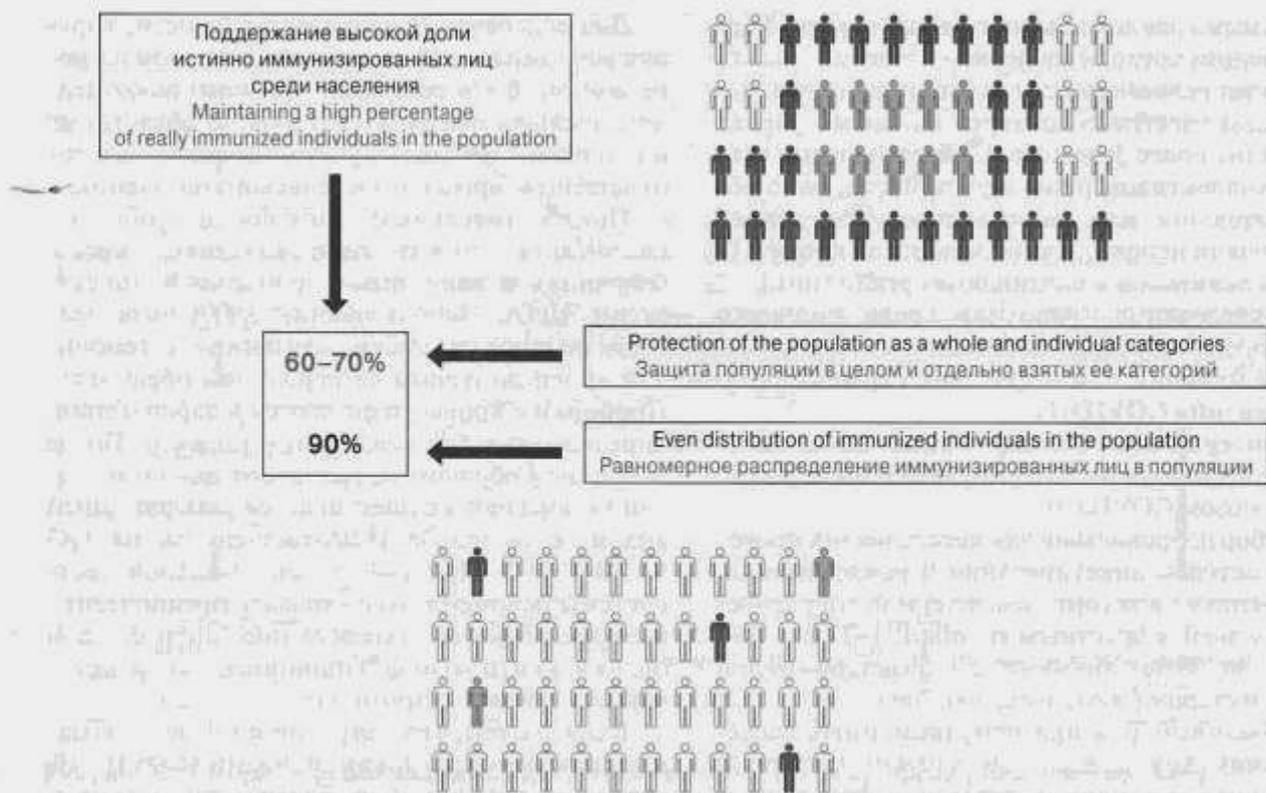
COVID-19», и которая была успешно реализована в 26 регионах РФ с июня 2020 года по март 2021 года.

Задачи, решаемые в рамках изучения популяционного иммунитета к SARS-CoV-2:

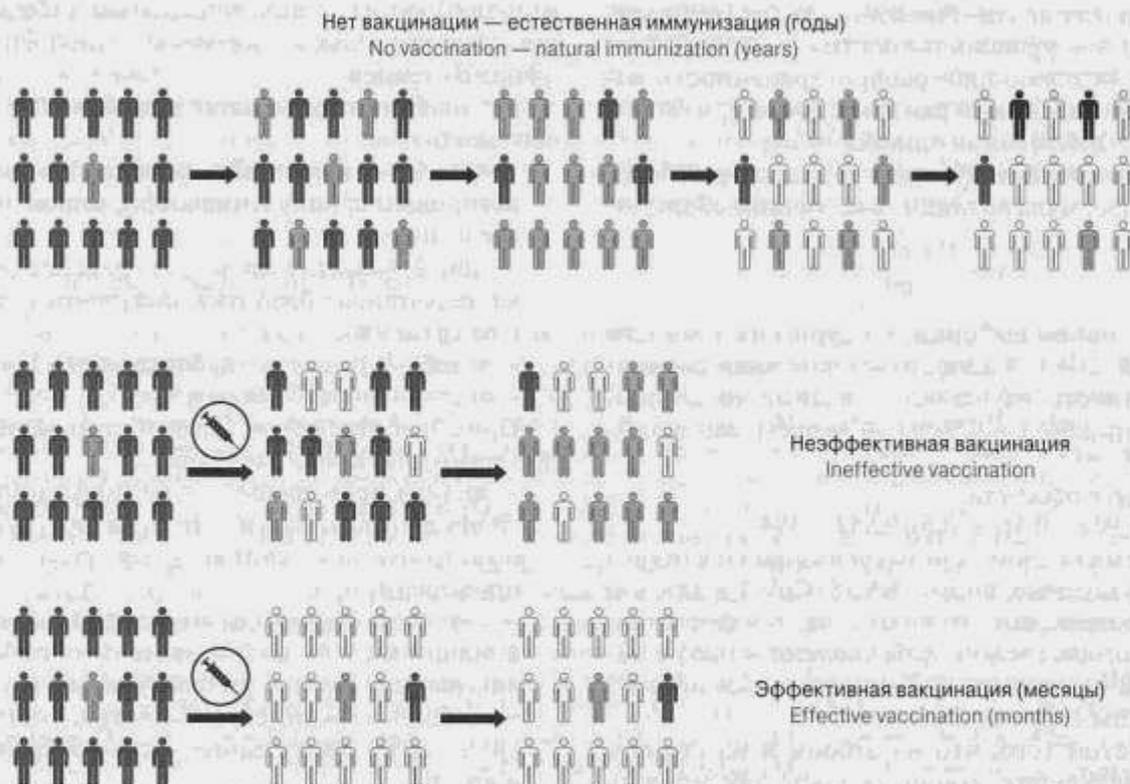
1. объективная оценка инфицированности (серопревалентности) к SARS-CoV-2 совокупного населения и населения различных возрастных групп;
2. разработка прогноза динамики заболеваемости и планирование профилактических мероприятий;
3. косвенная оценка факторов инфицирования;
4. изучение процесса формирования постинфекционного гуморального иммунитета к SARS-CoV-2.

Программа была разработана с учетом рекомендаций ВОЗ в формате продольного когортного исследования со стратификацией по возрасту:

- на первом этапе формируется когорта волонтеров;
- на втором и последующих этапах проводится обследование сформированной на первом этапе когорты;
- число этапов зависит от эпидситуации.



**Рисунок 1. Коллективный иммунитет — основа защиты населения от инфекции**  
 Figure 1. Herd immunity — the basis for protecting population from infection



**Рисунок 2. Модель формирования коллективного иммунитета при естественной иммунизации и проведении специфической профилактики**  
 Figure 2. Model of developing herd immunity during natural immunization and specific prophylaxis

Помимо рандомизации по возрасту при формировании когорты на первом этапе соблюдали принцип равномерности охвата популяции, исключали участие волонтеров из одного учреждения (не более 30 человек), объединенных единым коллективом (одно предприятие, одно образовательное или медицинское учреждение), исключали использование донорской крови или крови пациентов медицинских организаций.

Обследование проводили среди здорового детского и взрослого населения вне зависимости от наличия или отсутствия перенесенного заболевания COVID-19.

Критерий исключения — лица, находящиеся на стационарном или амбулаторном лечении, с диагнозом COVID-19.

Отбор добровольцев для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации. Включенные в когорту волонтеры были распределены по 7 возрастным группам: 1–17 лет, 18–29 лет, 30–39 лет, 40–49 лет, 50–59 лет, 60–69 лет, 70 лет и старше (обозначена как 70+).

Объем выборки при популяционных исследованиях для каждой возрастной категории в каждом из регионов определен по формуле согласно руководству [19]:

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)N}{m^2N + t^2 \times p(1-p)N}$$

где  $n$  — объем выборки;  $N$  — размер генеральной совокупности (численность исследуемой группы);  $t$  — уровень точности (для 95% ДИ  $t = 1,96$ );  $p$  — оценочная распространенность изучаемого явления (в данном случае при 50% = 0,5);  $m$  — допустимая ошибка — 5%.

При численности возрастной категории более 0,5 млн формула выглядит следующим образом:

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2}$$

где  $n$  — объем выборки;  $t$  — уровень точности (для 95% ДИ  $t = 1,96$ );  $p$  — оценочная распространенность изучаемого явления (в данном случае при 50% = 0,5);  $m$  — допустимая ошибка — 5%.

Пример расчета:

$$n = 1,962 \times 0,5(1 - 0,5)/0,052 = 384.$$

Таким образом, для изучения коллективного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в каждом регионе на первом этапе проводится формирование когорты волонтеров численностью не менее 2688 человек (по 384 человек в каждой из 7 возрастных групп).

С учетом того, что на втором и на каждом из последующих этапов реально обследовать 60–70% от выборки волонтеров, сформированной на первом этапе, рекомендуемая численность выборки волонтеров в каждом регионе составляет 2800 человек.

Для обеспечения репрезентативности, наряду с рандомизацией по возрасту, в каждом регионе должен быть соблюден принцип равномерного распределения волонтеров по областному и районным центрам с учетом процентного соотношения городского и сельского населения.

Предпочтительным материалом для исследования служит периферическая кровь, собранная в вакуумные пробирки в присутствии ЭДТА. Использование ЭДТА позволяет минимизировать риски, связанные с гемолизом крови до начала ее первичной обработки. Пробирки с кровью передаются в лаборатории, определенные для реализации проекта. После первичной обработки, транспортировки и хранения образцов осуществляется лабораторный анализ с помощью ИФА-тест-систем на IgG SARS-CoV-2. При выборе оптимальной тест-системы рекомендуется отдавать предпочтение количественному определению антител для оценки как постинфекционного, так и поствакцинального иммунитета.

В связи с тем, что популяционное исследование проводится в условиях пандемии COVID-19, оптимальный срок сбора биоматериала на каждом из этапов составляет не более 5–7 дней.

Анкетирование, отбор волонтеров, их запись на сдачу крови, а также обработка результатов реализуются только с помощью технологии облачного сервиса (рис. 3). Реализация второго и последующих этапов программы также осуществляется только с помощью технологии облачного сервиса.

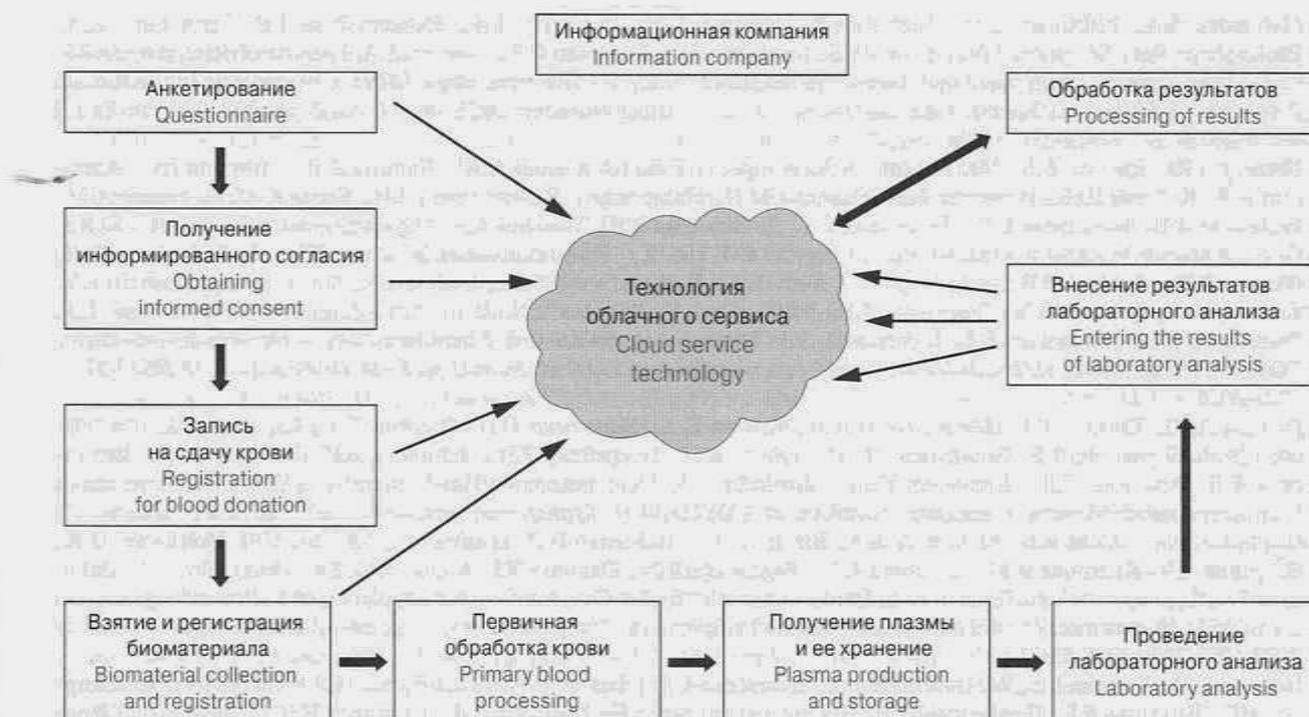
Реализация первого этапа проводится в несколько шагов:

- шаг 1 — информационная кампания, анкетирование; получение информированного согласия;
- шаг 2 — взятие крови, ее транспортировка, первичная обработка, получение плазмы и ее хранение;
- шаг 3 — проведение лабораторного анализа;
- шаг 4 — обработка результатов.

При обработке результатов исследования необходимо учитывать следующее:

- анализ проводится как по популяции региона в целом, так и в разных подгруппах: по возрасту, полу, социальному статусу и/или профессии;
- с учетом структуры населения, занятого в экономике, по видам деятельности выделяются как минимум следующие группы: промышленность, строительство, торговля, транспорт, образование, здравоохранение и другие.

Данная программа и технология ее реализации прошла успешную апробацию в 26 регионах Российской Федерации. Это Амурская область, Астраханская область, Белгородская область,



**Рисунок 3. Алгоритм реализации каждого этапа с помощью технологии облачного сервиса**

Figure 3. Algorithm for enabling each stage by using the technology of cloud service

Владимирская область, Иркутская область, Калининградская область, Краснодарский край, Красноярский край, Ленинградская область, Москва, Московская область, Мурманская область, Нижегородская область, Новосибирская область, Приморский край, Республика Крым, Республика Татарстан, Ростовская область, Санкт-Петербург, Саратовская область, Свердловская область, Ставропольский край, Тульская область, Тюменская область,

Хабаровский край, Челябинская область [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20]. Таким образом, в настоящее время Роспотребнадзором разработана методология и создана эффективно работающая система серологического мониторинга по оценке уровня популяционного иммунитета в разных регионах Российской Федерации для прогнозирования эпидемиологической ситуации, выработки рекомендаций, планирования вакцинации.

## Список литературы/References

1. Попова А.Ю., Андреева Е.Е., Бабура Е.А., Балахонov С.В., Башкетова Н.С., Бугоркова С.А., Буланов М.В., Валеуллина Н.Н., Горяев Д.В., Детковская Н.Н., Ежлова Е.Б., Зайцева Н.Н., Историк О.А., Ковальчук И.В., Козловских Д.Н., Комбарова С.Ю., Курганова О.П., Ломовцев А.Э., Лукичева Л.А., Лялина Л.В., Мельникова А.А., Михайлова О.М., Носков А.К., Носкова Л.Н., Оглезнева Е.Е., Осмоловская Т.П., Пяташина М.А., Пеньковская Н.А., Самойлова Л.В., Смирнов В.С., Степанова Т.Ф., Троценко О.Е., Тотолян А.А. Особенности серопревалентности к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 у детей в период эпидемии COVID-19 2020 года // Педиатрия. 2021. Т. 100, № 3. С. 97–106. [Popova A.Yu., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bugorkova S.A., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Goryaev D.V., Detkovskaya N.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istorik O.A., Koval'chuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.Yu., Kurganova O.P., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Mel'nikova A.A., Mikhailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Pen'kovskaya N.A., Samoiloa L.V., Smirnov V.S., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian A.A. Peculiarities of SARS-CoV-2 nucleocapsid in children during the COVID-19 epidemic of 2020. *Pediatrya = Pediatrics*, 2021, vol. 100, no. 3, pp. 97–106. (In Russ.) doi: 10.24110/0031-403X-2021-100-3-97-106]
2. Попова А.Ю., Андреева Е.Е., Бабура Е.А., Балахонov С.В., Башкетова Н.С., Буланов М.В., Валеуллина Н.Н., Горяев Д.В., Детковская Н.Н., Ежлова Е.Б., Зайцева Н.Н., Историк О.А., Ковальчук И.В., Козловских Д.Н., Комбарова С.Ю., Курганова О.П., Кутырев В.В., Ломовцев А.Э., Лукичева Л.А., Лялина Л.В., Мельникова А.А., Михайлова О.М., Носков А.К., Носкова Л.Н., Оглезнева Е.Е., Осмоловская Т.П., Пяташина М.А., Пеньковская Н.А., Самойлова Л.В., Смирнов В.С., Степанова Т.Ф., Троценко О.Е., Тотолян А.А. Особенности формирования серопревалентности населения Российской Федерации к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 в первую волну эпидемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 2. С. 297–323. [Popova A.Yu., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Goryaev D.V., Detkovskaya N.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istorik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.Yu., Kurganova O.P., Kutyrer V.V., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Mel'nikova A.A., Mikhailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Pen'kovskaya N.A., Samoiloa L.V., Smirnov V.S., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian A.A. Peculiarities of seroprevalence formation of the population of the Russian Federation to the SARS-CoV-2 nucleocapsid in the first wave of the COVID-19 epidemic // *Infection and Immunity*. 2021. T. 11, No. 2. P. 297–323.]

- Melnikova A.A., Mikailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Samoilo L.V., Smirnov V.S., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian A.A. Features of developing SARS-CoV-2 nucleocapsid protein population-based seroprevalence during the first wave of the COVID-19 epidemic in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 297–323. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-FOD-1684
3. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Андреева Е.Е., Комбарова С.Ю., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Алешкин А.В., Кобзева Ю.В., Игнатова Е.Н., Осадчая М.Н., Назаренко Е.В., Антипова Л.Н., Басов А.А., Затевалов А.М., Новикова Л.И., Бочкарева С.С., Лиханская Е.Т., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Коллективный иммунитет к SARS-CoV-2 жителей Москвы в эпидемический период COVID-19 // *Инфекционные болезни*. 2020. Т. 18, № 1. С. 8–16. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Andreeva E.E., Kombarova S.Yu., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Aleshkin A.V., Kobzeva Yu.V., Ignatova E.N., Osadchaya M.N., Nazarenko E.V., Antipova L.N., Basov A.A., Zatevalov A.M., Novikova L.I., Bockkareva S.S., Likhanskaia E.T., Lomonosova V.I., Totolian A.A. SARS-CoV-2 herd immunity in Moscow citizens during COVID-19 epidemic period. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 8–16. (In Russ.) doi: 10.20953/1729-9225-2020-4-8-16]
  4. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Бабура Е.А., Михеенко О.П., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Молчанова Ж.Р., Горбатова Я.В., Харитонов М.Н., Зубова А.Н., Погребная Т.Н., Данилова В.И., Кухарчук С.В., Дудинская Е.В., Арбузова Т.В., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Калининградской области в эпидемический сезон COVID-19 // *Журнал инфектологии*. 2020. Т. 12, № 5. С. 62–71. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Babura E.A., Mikheenko O.P., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Molchanova J.R., Gorbatova Y.V., Kharitonova M.N., Zubova A.N., Pogrebnaya T.N., Danilova V.I., Kukharchuk S.V., Dudinskaya E.V., Arbuzova T.V., Lomonosova V.I., Totolian A.A. Herd immunity of SARS-CoV-2 among the population of Kaliningrad region amid the COVID-19 epidemic. *Zhurnal infekologii = Journal of Infectology*, 2020, vol. 12, no. 5, pp. 62–71. (In Russ.) doi: 10.22625/2072-6732-2020-12-5-62-71]
  5. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Дубровина В.И., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Трухина А.Г., Пережогин А.Н., Пятидесятникова А.Б., Брюхова Д.Д., Киселева Н.О., Гэфан Н.Г., Гаврилова О.В., Гаврилова Т.А., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Опыт исследования серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 населения Иркутской области в период вспышки COVID-19 // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020. № 3. С. 106–113. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Dubrovina V.I., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Trukhina A.G., Perezhogin A.N., Pyatidesyatnikova A.B., Bryukhova D.D., Kiseleva N.O., Gefan N.G., Gavrilova O.V., Gavrilova T.A., Lomonosova V.I., Totolian A.A. Experience in studying seroprevalence to SARS-CoV-2 virus in the population of the Irkutsk Region during COVID-19 outbreak. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 3, pp. 106–113. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-106-113]
  6. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чхинджерия И.Г., Гречанинова Т.А., Агапов К.А., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Бацунов О.К., Данилова Е.М., Зуева Е.В., Комкова Д.В., Кузнецова Р.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ломоносова В.И., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19 // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020. Т. 3. С. 124–130. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chkhindzheriya I.G., Grechaninova T.A., Agapov K.A., Arsent'eva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Lomonosova V.I., Vetrov V.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolian A.A. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population in Saint-Petersburg during the COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, vol. 3, pp. 124–130. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130]
  7. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Данилова Т.Е., Буланов М.В., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Тотолян А.А. Анализ серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения Владимирской области в период эпидемии COVID-19 // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2021. Т. 11, № 2. С. 29–35. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Danilova T.E., Bulanov M.V., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Totolian A.A. Analysis of seroprevalence to SARS-CoV-2 in population of Vladimir Region during COVID-19 epidemic. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 29–35. (In Russ.) doi: 10.18565/epidem.2021.11.2.29-35]
  8. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Черный М.А., Балабышева Н.С., Логинова И.С., Владимиров О.С., Самоглядова И.С., Васев Н.А., Румянцева С.В., Чупалова Е.Ю., Селиванова Г.В., Муравьева М.В., Тимофеева Л.В., Ханкишиева Э.Н., Тильчевская В.Д., Никитенко Н.Д., Костеницкая Т.И., Виркунен Н.В., Климкина И.М., Кузьмина Т.М., Дегтяренко Н.В., Бацунова А.И., Филиппова Л.А., Пальчикова Н.А., Кукшкин А.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Богумильчик Е.А., Воскресенская Е.А., Дробышевская В.Г., Зуева Е.В., Кокорина Г.И., Курова Н.Н., Любимова Н.Е., Ферман Р.С., Хамдулаева Г.Н., Хамитова И.В., Хорькова Е.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19 // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020. № 3. С. 114–123. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Istoriik O.A., Mosevich O.S., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Cherny M.A., Balabysheva N.S., Loginova I.S., Vladimirova O.S., Samoglyadova I.S., Vasev N.A., Rumyantseva S.V., Chupalova E.Yu., Selivanova G.V., Muraviova M.V., Timofeeva L.V., Khankishieva E.N., Tylchevskaya V.D., Nikitenko N.D., Kostenskaya T.I., Virkunen N.V., Klimkina I.M., Kuzmina T.M., Degtyarenko N.V., Bazunova A.I., Filippova L.A., Palchikova N.A., Kukshkin A.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Bogumilchik E.A., Voskresenskaya E.A., Drobyshevskaya V.G., Zueva E.V., Kokorina G.I., Kurova N.N., Lyubimova N.E., Ferman R.S., Khamdulaeva G.N., Khamitova I.V., Khorkova E.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolian A.A. Assessment of the herd immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Leningrad Region during the during COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 3, pp. 114–123. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-114-123]

9. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Кутырев В.В., Кожанова О.И., Черкасская Т.С., Лялина В.И., Смирнов В.С., Щербаклова С.А., Бугоркова С.А., Портенко С.А., Найденова Е.В., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Характеристика популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 у жителей Саратова и Саратовской области в период эпидемии COVID-19 // Проблемы особо опасных инфекций. 2020, № 4. С. 106–116. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Kutuyev V.V., Kozhanova O.I., Cherkasskaya T.S., Lyalina V.I., Smirnov V.S., Bugorkova S.A., Portenko S.A., Naydenova E.V., Shcherbakova S.A., Lomonosova V.I., Totolian A.A. Analysis of seroprevalence to SARS-CoV-2 in population of Vladimir Region during COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 4, pp. 106–116. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2020-4-106-116
10. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Лукичева Л.А., Никитина Л.И., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Кольцов Н.С., Ермакова М.В., Кубашев А.К., Кузнецова В.В., Денисова Т.В., Гурина Н.В., Зиборов И.В., Грязова И.В., Панькова Н.А., Коношкин П.И., Михеева Н.И., Шарова А.А., Тотолян А.А. Гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2 у населения Мурманской области на фоне заболеваемости COVID-19 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2021. Т. 13, № 1. С. 17–27. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Lukicheva L.A., Nikitina N.I., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Koltsov N.S., Ermakova M.V., Kubashev A.K., Kuznetsova V.V., Denisova T.V., Gurina N.V., Ziborov I.V., Gryazova I.V., Pankova N.A., Konoshkin P.I., Mikheeva N.I., Sharova A.A., Totolian A.A. Humoral immunity to SARS-CoV-2 among the population of Murmansk region amid COVID-19 epidemic. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2021, vol. 13, no. 1, pp. 17–27. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2021-13-1-17-27
11. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Михайлова О.М., Комбарова С.Ю., Костина М.А., Алешкин А.В., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Гвазава К.Р., Козлов А.В., Чапов Е.В., Сычев Д.А., Хаттатова Н.В., Басов А.А., Затева-лов А.М., Новикова Л.И., Бочкарева С.С., Лиханская Е.И., Шарова А.А., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Структура серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 среди жителей Московской области в период эпидемической заболеваемости COVID-19 // Инфекционные болезни. 2020. Т. 18, № 4. С. 17–26. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Mikhailova O.M., Kombarova S.Yu., Kostina M.A., Aleshkin A.V., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Gvazava K.R., Kozlov A.V., Chapov E.V., Sychev D.A., Khattatova N.V., Basov A.A., Zatevalov A.M., Novikova L.I., Bochkareva S.S., Likhanskaya E.I., Sharova A.A., Lomonosova V.I., Totolian A.A. Characteristics of SARS-CoV-2 virus seroprevalence in population of Moscow Region during COVID-19 epidemic. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2020, vol. 18, no. 4, pp. 17–26. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2020-4-17-26
12. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Носков А.К., Ковалев Е.В., Карпушенко Г.В., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чемисова О.С., Тришина А.В., Березняк Е.А., Воловикова С.В., Стеннина С.И., Янович Е.Г., Мелоян М.Г., Асмолова Н.Ю., Усова А.А., Слишь С.С., Тотолян А.А. Оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 на территории Ростовской области // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 4. С. 117–124. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Noskov A.K., Kovalev E.V., Karpushchenko G.V., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chemisova O.S., Trishina A.V., Bereznyak E.A., Volovikova S.V., Stenina S.I., Yanovich E.G., Meloyan M.G., Asmolova N.Yu., Usova A.A., Slis' S.S., Totolian A.A. Assessment of population immunity to SARS-CoV-2 Virus in the Rostov Region. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 4, pp. 117–124. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2020-4-117-124
13. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Оглезнева Е.Е., Красноперов А.С., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Демин А.Д., Кобринцев Ж.В., Черскова А.Ю., Жидков В.А., Величенко Д.А., Арбузова Т.В., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Серопревалентность к SARS-CoV-2 среди населения Белгородской области на фоне эпидемии COVID-19 // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2021. Т. 11, № 1. С. 18–24. (в печати). [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Oglezneva E.E., Krasnoperov A.S., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Dyomin A.D., Kobrinets Zh.V., Cherskova A.Yu., Zhidkov V.A., Velitchenko D.A., Arbuzova T.V., Lomonosova V.I., Totolian A.A. SARS-CoV-2 seroprevalence in population of Belgorod Region during COVID-19 epidemic. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 18–24. (In Russ.)] doi: 10.18565/epidem.2021.11.1.18-24
14. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Пяташина М.А., Сизова Е.П., Юзлибаева Л.Р., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Бадамшина Г.Г., Гончарова А.В., Арбузова Т.В., Ломоносова В.И., Тотолян А.А. Характеристика серопревалентности к SARS-CoV-2 среди населения Республики Татарстан на фоне COVID-19 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97, № 6. С. 518–528. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Pityashina M.A., Sizova E.P., Yuzlibaeva L.R., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Badamshina G.G., Goncharova A.V., Arbuzova T.V., Lomonosova V.I., Totolian A.A. Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Republic of Tatarstan during the COVID-19 epidemic period. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 6, pp. 518–528. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-2
15. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Смирнов В.С., Лялина Л.В., Горяев Д.В., Ходов Д.А., Чепижко Т.Г., Русин М.В., Кузнецова Н.Н., Безручко Е.Ю., Кочергина А.С., Каримов В.Р., Шарова А.А., Ветров В.В., Тотолян А.А. Структура популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 населения Красноярского края в эпидемию COVID-19 // Acta Biomedica Scientifica. 2021. № 3 (принята к печати). [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Smirnov V.S., Lyalina L.V., Goryaev D.V., Khodov D.A., Chepizhko T.G., Rusin M.V., Kuznetsova N.N., Bezruchko E.Yu., Kochergina A.S., Karimov V.R., Sharova A.A., Vetrov V.V., Totolian A.A. Structure of population immunity to SARS-CoV-2 in Krasnoyarsk region during the COVID-19 epidemic. *Acta Biomedica Scientifica*, 2021, no. 3 (in print). (In Russ.)]
16. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Смирнов В.С., Лялина Л.В., Козловских Д.Н., Лучинина С.В., Романов С.В., Валеуллина Н.Н., Диконская О.В., Чиркова Г.Г., Малых О.Л., Пономарева А.В., Чистякова И.В., Кильячина А.С., Юровских А.И., Котова А.А., Тотолян А.А. Особенности серопревалентности к SARS-CoV-2 населения Среднего и Южного Урала в ранний период пандемии COVID-19 // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 3 (принята к печати). [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Smirnov V.S., Lyalina L.V., Kozlovskikh D.N., Luchinina S.V., Romanov S.V., Valeullina N.N., Dikonskaya O.V., Chirkova G.G., Malykh O.L., Ponomareva A.V., Chistyakova I.V., Kilyachina A.S., Yurovskikh A.I., Kotova A.A., Totolian A.A. Peculiarities of seroprevalence to SARS-CoV-2 in the population of the Middle and Southern Urals during the early period of the COVID-19 pandemic. *Epidemiologiya i vaktino-profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2021, vol. 20, no. 3 (in print). (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-3

17. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Степанова Т.Ф., Шарухо Г.В., Летюшев А.Н., Фольмер А.Я., Шепоткова А.А., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Степанова К.Б., Панина Ц.А., Сидоренко О.Н., Иванова Н.А., Смирнова С.С., Мальченко И.Н., Охотникова Е.В., Стахова Е.Г., Тотолян А.А. Распределение серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Тюменской области в эпидемическом периоде COVID-19 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020. Т. 97, № 5. С. 392–400. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Stepanova T.F., Sharukho G.V., Letyushev A.N., Folmer A.Ya., Shepotkova A.A., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Stepanova K.B., Panina Ts.A., Sidorenko O.N., Ivanova N.A., Smirnova S.S., Malchenko I.N., Okhotnikova E.V., Stakhova E.G., Totolian A.A. Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Tyumen Region during the COVID-19 epidemic period. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 5, pp. 392–400. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-1
18. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Лялина Л.В., Гарбуз Ю.А., Смирнов В.С., Ломоносова В.И., Балахонцева Л.А., Котова В.О., Базыкина Е.А., Бутакова Л.В., Сапега Е.Ю., Алейникова Н.В., Бебенина Л.А., Лосева С.М., Каравянская Т.Н., Тотолян А.А. Уровень серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Хабаровского края на фоне эпидемии COVID-19 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021. Т. 98, № 1. С. 7–17. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Trotsenko O.E., Zaitseva T.A., Lyalina L.V., Garbuz Yu.A., Smirnov V.S., Lomonosova V.I., Balakhontseva L.A., Kotova V.O., Bazykina E.A., Butakova L.V., Sapega E.Yu., Aleinikova N.V., Bebenina L.A., Loseva S.M., Karavyanskaya T.N., Totolian A.A. The seroprevalence of SARS-CoV-2 among residents of the Khabarovsk Krai during the COVID-19 epidemic. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2021, vol. 98, no. 1, pp. 7–17. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-92
19. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.*, 1998, vol. 17, pp. 857–872.
20. Popova A.Y., Smirnov V.S., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bugorkova S.A., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Vetrov V.V., Goryaev D.V., Detkovskaya T.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istorik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.Y., Kurganova O.P., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Melnikova A.A., Mikailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Samoilo L.V., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian A.A. SARS-CoV-2 seroprevalence structure of the Russian population during the COVID-19 pandemic. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 8: 1648. doi: 10.3390/v13081648

**Авторы:**

**Попова А.Ю.**, д.м.н., профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия;

**Тотолян А.А.**, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

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

**Totolian A.A.**, RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.07.2021

Принята к печати 02.08.2021

Received 14.07.2021

Accepted 02.08.2021

# COVID-19 КАК ЗООНОЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ

А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая, Н.С. Саркисян, А.С. Волюнкина

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

**Резюме.** В статье рассматриваются вопросы соответствия новой коронавирусной инфекции COVID-19 зоонозам на основании данных о вероятном происхождении вируса SARS-CoV-2, возможном формировании его резервуара в организме животных (летучих мышей) и восприимчивости к нему человека. Сегодня преобладает точка зрения, что вспышка COVID-19 возникла в результате преодоления коронавирусом SARS-CoV-2 межвидового барьера, приобретения способности инфицировать человека и распространяться в этой популяции. Сравнительный филогенетический анализ на молекулярном уровне показал, что SARS-CoV-2 генетически наиболее близок к коронавирусам летучих мышей, в частности к штаммам RmYN02 и RaTG13, изолированным от подковообразной летучей мыши — вида, считающегося основным хозяином коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV. Выявлена способность коронавируса SARS-CoV-2 инфицировать различные виды диких животных. SARS-CoV-2 был обнаружен у норок на фермах в странах Западной Европы и США, смертность составила от 1,2 до 2,4%. При инфицировании коронавирусом SARS-CoV-2 макак-резусов у них имела место продуктивная инфекция, была обнаружена вирусемия. Установлено, что кошки являются восприимчивыми хозяевами человеческого вируса SARS-CoV-2. Вероятное объяснение этому кроется в высокой степени сходства между человеческими и кошачьими формами рецептора ACE2. Также показано, что собаки могут заразиться, но не передают вирус другим животным. На сегодняшний день Всемирная организация по охране здоровья животных за весь период пандемии не располагает сведениями о случаях заражения человека от домашних питомцев. Таким образом, нет доказательств того, что животные играют роль в распространении SARS-CoV-2 среди людей в текущий период пандемии. Вспышки среди людей вызваны передачей вируса от человека к человеку, и, исходя из информации, доступной на сегодняшний день, риск распространения COVID-19 от животных считается низким. Необходимы дополнительные исследования, чтобы понять, как может COVID-19 затронуть животных самых разных видов и насколько велики риски передачи инфекции от них людям.

**Ключевые слова:** COVID-19, SARS-CoV-2, зооноз, коронавирусы, летучие мыши, дикие и домашние животные.

## COVID-19 AS A ZOOZOTIC INFECTION

Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Sarkisyan N.S., Volynkina A.S.

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation

**Abstract.** Here we discuss the issues for attributing the new coronavirus infection COVID-19 to zoonoses based on the data on probable origin of the SARS-CoV-2 virus, the possible formation of its reservoir in animals (bats) as well as human susceptibility. Today, the dominant point of view is that the outbreak of COVID-19 arose as a result of the SARS-CoV-2 coronavirus overcoming the interspecies barrier, acquiring ability to infect and spread in human population. Comparative phylogenetic analysis at the molecular level showed that SARS-CoV-2 is genetically closest to bat coronaviruses, particularly to the RmYN02 and RaTG13 strains isolated from the horseshoe bat, a species considered to be the main host of SARS-CoV and MERS-CoV coronaviruses. The ability of the SARS-CoV-2 coronavirus to infect various wild animal has been

### Адрес для переписки:

Саркисян Нушик Сааковна  
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15, ФКУЗ  
Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (962) 425-01-29. Факс: 8 (865) 226-03-12.  
E-mail: nyshik25@yandex.ru

### Contacts:

Nushik S. Sarkisyan  
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,  
Stavropol Plague Control Research Institute.  
Phone: +7 (962) 425-01-29. Fax: 8 (865) 226-03-12.  
E-mail: nyshik25@yandex.ru

### Для цитирования:

Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Саркисян Н.С., Волюнкина А.С. COVID-19 как зоонозная инфекция // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 617–623. doi: 10.15789/2220-7619-CAA-1621

### Citation:

Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Sarkisyan N.S., Volynkina A.S. COVID-19 as a zoonotic infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 617–623. doi: 10.15789/2220-7619-CAA-1621

revealed. SARS-CoV-2 has been found in minks on farms in the Netherlands with mortality rates ranging from 1.2 to 2.4%. While infecting rhesus monkeys with the SARS-CoV-2, it resulted in productive infection and detected viremia. Cats have been found to be susceptible hosts for the human SARS-CoV-2 virus. A likely explanation for this lies in the high similarity between the human and feline counterpart of the ACE2 receptor. It has been shown that dogs can become infected but transmit no virus to other animals. To date, over the entire period of the pandemic the World Organization for Animal Health provides no information about cases of human infection transmitted from pets. Thus, there is no evidence that animals play a role in the spread of SARS-CoV-2 among people during the current period of the pandemic. Human outbreaks are caused by human-to-human virus transmission, and based on the currently available information, the risk of spreading COVID-19 from animals is considered low. More research is needed to understand how COVID-19 can affect animals of a wide variety of species and how big might be the risks of infection transmission from them to humans.

**Key words:** COVID-19, SARS-CoV-2, zoonosis, coronaviruses, bats, wild and domestic animals.

Восприимчивость организма к инфекциям определяется как его способность реагировать на патогенный микроорганизм возникновением болезни или носительства возбудителя инфекции. Выделяют две группы факторов, обеспечивающих невосприимчивость индивидуума к возбудителям инфекции: факторы неспецифической (врожденной) резистентности и специфический (приобретенный) иммунитет. Механизмы естественной резистентности и адаптивного иммунитета определяет чувствительность организма к конкретному патогену, в том числе и в плане возможного преодоления им межвидового барьера.

В отечественной литературе для обозначения болезней животных, к которым восприимчив человек, используют понятие «зоонозы» («зооантропонозы»). Инфекции, обозначаемые этим термином, эволюционно сформировались в результате адаптации их возбудителей к обитанию не только в организмах животных, но и человека. Термин «зооантропонозы», по мнению Б.Л. Черкасского [5], теоретически более точно выражает сущность болезней, которыми человек заражается от животных. Однако термин «зоонозы», обозначающий группу инфекционных (паразитарных) болезней, резервуаром возбудителей которых являются животные, но к которым восприимчив человек, получил сегодня широкое распространение в мире и официально принят Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (Food and Agriculture Organization, FAO).

К зоонозам относят большинство инфекционных болезней, ставших в последние десятилетия причинами чрезвычайных эпидемических ситуаций (болезнь Эбола, лихорадка Зика и др.). По оценкам ВОЗ, более 75% новых заболеваний, обнаруженных за последнее десятилетие, имеют зоонозное происхождение [4].

Глобальное распространение возбудителя COVID-19 — SARS-CoV-2 — обусловило необходимость всеобъемлющего изучения его природы. Коронавирусы широко известны как возбудители инфекционных болезней животных

и птиц. Способность их инфицировать новых хозяев привела к переходу коронавирусов с диких млекопитающих на человека и возникновению вспышек SARS и MERS. Сегодня преобладает точка зрения, что вспышка COVID-19 возникла в результате преодоления коронавирусом SARS-CoV-2 видового барьера, приобретения способности инфицировать человека и распространяться в человеческой популяции.

Предположительно, изначально источником коронавируса SARS-CoV-2 являлось дикое животное, от которого произошло инфицирование человека [18, 20, 32]. Первые больные были выявлены в г. Ухань (провинция Хубэй, Китай) и, как считается, имели общее место заражения — оптовый рынок южно-китайских морепродуктов, где для употребления в пищу предлагают продукты из различных диких и домашних животных, в том числе не прошедших термическую обработку: птиц, летучих мышей, змей, ящеров, черепах, ежей, барсуков [15, 18, 21, 27, 28, 46, 47]. В дальнейшем новый коронавирус распространялся путем передачи его от человека к человеку. Использование вирусом SARS-CoV-2 в качестве биологических хозяев и естественных резервуаров различных видов животных, а также восприимчивость к нему человека позволяет отнести COVID-19 к зоонозам.

Новый коронавирус SARS-CoV-2 (2019-nCoV) относится к отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, к роду *Betacoronavirus*, к которому также принадлежат коронавирусы SARS-CoV и MERS-CoV. Коронавирусы SARS-CoV-2 и SARS-CoV относятся к подроду *Sarbecovirus*, включающему ряд коронавирусов, обнаруженных у летучих мышей, в том числе у подковообразных летучих мышей (род *Rhinolophus*).

Коронавирус SARS-CoV-2 на нуклеотидном уровне на 88–89% имеет сходство с двумя коронавирусами летучих мышей (bat-SL-CoVZC45 и bat-SL-CoVZXC21), на 50–51,8% — с коронавирусом MERS-CoV и на 79% идентичен вирусу SARS-CoV [9, 13, 16, 17, 29].

Сравнительный филогенетический анализ показал, что SARS-CoV-2 генетически более бли-

зок к коронавирусам летучих мышей, в частности к штаммам Bat CoV RmYN02 и Bat CoV RaTG13 (96% сходства), изолированным от подковообразной летучей мыши — вида летучих мышей, считающегося основным хозяином коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV [29, 30, 36, 37]. Большинство коронавирусов подрода *Sarbecovirus* выделены от летучих мышей рода *Rhinolophus*.

Появление новых коронавирусов и широкий круг их хозяев, вероятно, связаны с более высокой частотой генетических рекомбинаций и мутаций в области RBD гена S, а также высокой частотой ошибок при репликации вируса по сравнению с другими РНК-содержащими вирусами [10, 35, 42].

## Вероятные носители нового коронавируса SARS-CoV-2

Летучие мыши — идеальный резервуар для коронавирусов, поскольку вирусы постоянно циркулируют в их популяции, не вызывая симптомов инфекционного заболевания. Обитая в лесах, они передают вирус различным хозяевам, с которыми контактируют [14]. В Китае их продают не только для пищевых целей на рынках живых животных, но и для использования в традиционной китайской медицине. Летучие мыши изначально были резервуаром для SARS-CoV [24] и SARSr-CoV [16, 45], поэтому, вероятно, они стали резервуаром и SARS-CoV-2 [11, 38, 43, 49, 50].

Предполагается участие других промежуточных хозяев — панголинов, которые обеспечивают передачу SARS-CoV-2 человеку [8]. Анализ последовательностей генома показал, что коронавирусы панголинов принадлежат к двум филогенетическим линиям, и одна линия имеет 97,4% аминокислотной идентичности с рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка коронавируса с аналогичным участком белка SARS-CoV-2 [8]. Не исключено также, что в качестве промежуточного хозяина нового коронавируса могут выступать другие виды диких животных, кроме панголинов и летучих мышей.

## Способность коронавируса SARS-CoV-2 инфицировать различные виды диких животных

Коронавирусы имеют широкий спектр животных-хозяев, целый ряд видов животных являются носителями этих патогенов, и лишь у некоторых из них выявляется тяжелая инфекция [7].

Известно, что коронавирусы (CoV) способны заражать человека, а также домашних и диких животных, в большинстве случаев инфек-

ция имеет субклиническое течение [20, 25, 39]. Болезнь может проявляться различными симптомами, характерными для энтерита или поражений верхних дыхательных путей [12].

Коронавирусы SARS-CoV и SARS-CoV-2 (2019-nCoV) используют белок ACE2 в качестве рецептора проникновения в клетку [50]. Из-за мутации в области RBD гена S патогенность и трансмиссивность коронавирусов могут изменяться и усиливаться, диапазон хозяев может расширяться [10].

SARS-CoV-2 был обнаружен у норок на фермах в Дании, Италии, Нидерландах, Испании, Швеции и США [33]. В Дании, по состоянию на 8 ноября 2020 г., вирус был обнаружен на 229 (20%) из 1140 норковых ферм в стране. Смертность составила от 1,2 до 2,4% (в основном — беременные самки), у большинства вскрытых норок была выявлена интерстициальная пневмония [34]. Вариант коронавируса, у которого выявлены 4 аминокислотные замены в белке S, встречался только у норок и работников норковых ферм [22, 23]. Пока нет научно обоснованных данных о передаче вируса от норок человеку или наоборот.

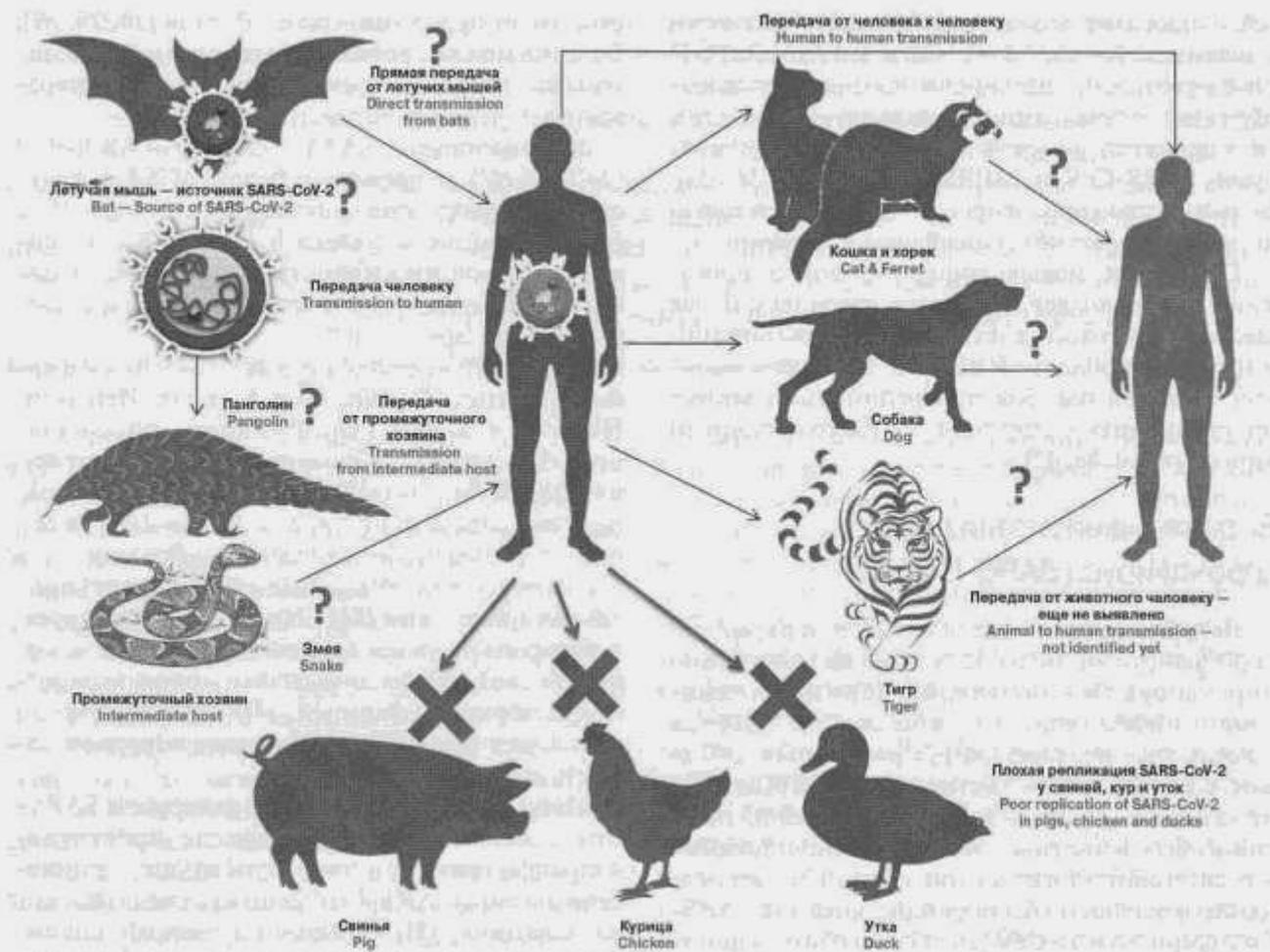
При инфицировании коронавирусом SARS-CoV-2 макак-резусов обнаружена продуктивная инфекция, при этом наибольшее количество вируса SARS-CoV-2 выявляли в мазках из зева/носа [31]. Филогенетический анализ показал, что мембранный белок ACE2 (рецептор для проникновения в клетку коронавируса SARS-CoV-2) у макак (*Macaca mulatta*) и шимпанзе (*Pan troglodytes*) наиболее близки к человеческому ACE2 (94,9–99% нуклеотидной идентичности) [41].

Результаты исследований [44] указывают на наличие зоонозной основы COVID-19 вследствие циркуляции вируса между различными видами позвоночных и людьми (рис.).

Особый интерес вызывает вопрос о возможности заражения людей от домашних питомцев — кошек и собак. Сейчас становится ясно, что кошки являются восприимчивыми хозяевами человеческого вируса SARS-CoV-2. Вероятное объяснение этому кроется в высокой степени сходства между человеческими и кошачьими формами рецептора ACE2. Филогенетический анализ показал, что белок ACE2 домашней кошки (*Felis catus*) близок к человеческому белку ACE2 с общей идентичностью нуклеотидной последовательности 85,2% [41].

Целый ряд публикаций подтверждает возможность заражения кошек в лабораторных условиях и передачи возбудителя инфекции среди сородичей [1, 33].

Подтверждено, что собаки могут заразиться, но не могут передавать вирус другим собакам. При исследовании 4000 образцов биоматериала



**Рисунок. Зоонозные связи SARS-CoV-2 [44]**  
 Figure. Zoonotic links for SARS-CoV-2 [44]

от собак, кошек и лошадей из мест, где происходила передача SARS-CoV-2 у людей, не было выявлено маркеров вируса, что позволяет предположить низкую вероятность передачи вируса от людей животным [19]. К выводу, что собаки и кошки не играют никакой роли в распространении коронавируса SARS-CoV-2, пришли также эксперты из Института Фридриха Леффлера (Грайфсвальд). Было высказано предположение, что, даже если домашние питомцы оказались инфицированы, это не означает, что вирус может размножаться в организме животного и выводиться наружу через слюну или экскременты [3].

Всемирная организация по охране здоровья животных за весь период пандемии не располагает сведениями о случаях заражения человека от домашних питомцев [2].

**Заключение**

Естественным резервуаром и источником нового коронавируса SARS-CoV-2 предположительно являются летучие мыши, а инфицирование людей произошло, возможно, через про-

межуточного хозяина [26]. В качестве промежуточных хозяев могут выступать панголины, хорьки, змеи [6, 12, 40, 48, 49].

Если первоначально SARS-CoV-2 передался от животных человеку, то затем основным способом передачи COVID-19 среди людей стала передача вируса от человека к человеку [18, 20, 32]. Ранее переход коронавирусов с диких млекопитающих на человека привел к возникновению вспышек SARS и MERS, но они не получили столь масштабного распространения, поскольку отсутствовала возможность воздушно-капельного пути передачи их возбудителей (аэрогенный механизм).

В текущий период пандемии нет доказательств того, что животные играют роль в распространении SARS-CoV-2 среди людей. Вспышки болезни вызваны передачей вируса от человека к человеку, и в соответствии с доступной на сегодняшний день информацией риск распространения COVID-19 с участием животных считается низким. Необходимы дополнительные исследования, чтобы понять, как SARS-CoV-2 может поражать животных разных видов, а также чтобы

определить возможность формирования новых резервуаров вируса и оценить, насколько велики риски передачи возбудителя инфекции от различных животных людям.

Сегодня нет доказательств того, что домашние животные (кошки, собаки) легко заражаются SARS-CoV-2 в естественных условиях, хотя предположительно в редких случаях они могут инфицироваться от людей, но не передают (практически не передают) вирус людям.

Антропогенный потенциал установлен у нескольких возбудителей зоонозных коронавирусных инфекций, таких как SARS, MERS, а теперь и COVID-19. Возникновение новых подобных инфекций неизбежно в будущем. Вспышка COVID-19 — еще один важный пример, доказывающий существование тесного и прямого взаимодействия людей и животных, что потенциально может привести к возникновению опасных пандемий зоонозного характера.

## Список литературы/References

1. СМИ сообщили о заражении коронавирусом двух кошек в США // РБК. 2020. [The media reported on the infection of two cats with coronavirus in the USA. *RBC*, 2020. (In Russ.)] URL: <https://www.rbc.ru/rbcfreenews/5ea101369a79476145076469> (03.10.2020)
2. Соболева И. Хвостатые на карантине: почему зараженные COVID-19 кошки не опасны для хозяев // Москва24, 2020. [Soboleva I. Animals on quarantine: why cats infected with COVID-19 are not dangerous for their owners. *Moskva24*, 2020. (In Russ.)] URL: [https://www.m24.ru/articles/obshchestvo/27052020/156734?utm\\_source=CopyBuf&https://www.m24.ru/?utm\\_source=CopyBuf](https://www.m24.ru/articles/obshchestvo/27052020/156734?utm_source=CopyBuf&https://www.m24.ru/?utm_source=CopyBuf) (03.10.2020)
3. Фройнд А., Позднякова Н. Кошки и собаки не могут заразить человека коронавирусом. А заразиться сами? // Deutsche Welle. 2020. [Freund A., Pozdnyakova N. Cats and dogs can't infect humans with coronavirus. And get yourself infected? *Deutsche Welle*, 2020. (In Russ.)] URL: <https://www.dw.com/ru/koshki-i-sobaki-ne-mogut-zarazit-cheloveka-koronavirusom/a-54430702> (03.10.2020)
4. Хусайнов Р.Х. Зоонозные заболевания // Medical Insider. 2018. [Khusainov R.H. Zoonotic diseases. *Medical Insider*, 2018. (In Russ.)] URL: <https://medicalinsider.ru/news/zooznyye-zabolevaniya/> (03.10.2020)
5. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.: Медицина, 2001. 560 с. [Cherkassky B.L. Guidelines for general epidemiology. *Moscow: Medicine*, 2001. 560 p. (In Russ.)]
6. Almendros A. Can companion animals become infected with COVID-19? *Vet. Rec.*, 2020, vol. 186, no. 12, pp. 388–389. doi: 10.1136/vr.m1322
7. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.*, 2020, vol. 26, no. 4, pp. 450–452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9
8. Boni M.F., Lemey P., Jiang X., Lam T.T., Perry B.W., Castoe T.A., Rambaut A., Robertson D.L. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat. Microbiol.*, 2020, vol. 5, no. 11, pp. 1408–1417. doi: 10.1038/s41564-020-0771-4
9. Chan J.F., Kok K.H., Zhu Z., Chu H., To K.K., Yuan S., Yuen K.Y. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 221–236. doi: 10.1080/22221751.2020.1719902
10. Chen J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV-A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect.*, 2020, vol. 22, no. 2, pp. 69–71. doi: 10.1016/j.micinf.2020.01.004
11. Cui J., Li F., Shi Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, vol. 17, no. 3, pp. 181–192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9
12. Dhama K., Patel S.K., Sharun K., Pathak M., Tiwari R., Yatoo M.I. SARS-CoV-2: Jumping the species barrier, lessons from SARS and MERS, its zoonotic spillover, transmission to humans, preventive and control measures and recent developments to counter this pandemic virus. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2020, vol. 37. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101830
13. Drexler J.F., Corman V.M., Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res.*, 2014, vol. 101, pp. 45–56. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.10.013
14. Fan Y., Zhao K., Shi Z.L., Zhou P. Bat coronaviruses in China. *Viruses*, 2020, vol. 11, no. 3: 210. doi: 10.3390/v11030210
15. Hu B., Ge X., Wang L.F., Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. *J. Virol.*, 2015, vol. 12, pp. 221. doi: 10.1186/s12985-015-0422-1
16. Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., Xie J.Z., Shen X.R., Zhang Y.Z., Wang N., Luo D.S. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.*, 2017, vol. 13, no. 11: e1006698. doi: 10.1371/journal.ppat.1006698
17. Hu D., Zhu C., Ai L., He T., Wang Y., Ye F., Yang L., Ding C., Zhu X., Lv R. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg. Microbes Infect.*, 2018, vol. 7, no. 1: 154. doi: 10.1038/s41426-018-0155-5
18. Hui D.S., Azhar E., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., Ippolito G., Mchugh T.D., Memish Z.A., Drosten C. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 91, pp. 264–266. doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.009
19. IDEXX SARS-CoV-2 (COVID-19) RealPCR Test. IDEXX. URL: <https://www.idexx.com/en/veterinary/reference-laboratories/idxx-sars-cov-2-covid-19-realpcr-test> (03.10.2020)
20. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J. Med. Virol.*, 2020a, vol. 92, no. 4, pp. 433–440. doi: 10.1002/jmv.25682
21. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Homologous recombination within the spike glycoprotein of the newly identified coronavirus may boost cross-species transmission from snake to human. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 4: 25682. doi: 10.1002/jmv.25682

22. Kort over kommuner med smittede minkfarme. *Fødevarestyrelsen*. 2020. URL: <https://www.foedevarestyrelsen.dk/Dyr/Dyr-og-Covid-19/Mink-og-COVID-19/Sider/Kort-over-kommuner-med-smittede-minkfarme.aspx> (03.10.2020)
23. Lassaunière R., Fonager J., Rasmussen M., Frische A., Strandh Ch. P., Rasmussen T.B., Bøtner A., Fomsgaard A. SARS-CoV-2 spike mutations arising in Danish mink and their spread to humans. URL: [https://files.ssi.dk/Mink-cluster-5-short-report\\_AFO2](https://files.ssi.dk/Mink-cluster-5-short-report_AFO2) (03.10.2020)
24. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, 2005, vol. 310, pp. 676–679. doi: 10.1126/science
25. Li X., Song Y., Wong G., Cui J. Bat origin of a new human coronavirus: there and back again. *Sci. China Life Sci.*, 2020, vol. 63, no. 3, pp. 461–462. doi: 10.1007/s11427-020-1645-7
26. Li X., Zai J., Zhao Q., Nie Q., Li Y., Foley B.T., Chaillon A. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 6, pp. 602–611. doi: 10.1002/jmv.25731
27. Liu J., Zheng X., Tong Q., Li W., Wang B., Sutter K., Trilling M., Lu M., Dittmer U., Yang D. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 5, pp. 491–494. doi: 10.1002/jmv.25709
28. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10224, pp. 565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
29. Malik Y.S., Sircar S., Bhat S., Sharun K., Dhama K., Dadar M., Tiwari R., Chaicumpa W. Emerging novel Coronavirus (2019-nCoV) – Current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet. Q.*, 2020, vol. 40, no. 1, pp. 68–76. doi: 10.1080/01652176.2020.1727993
30. Mohd H.A., Al-Tawfiq J.A., Memish Z.A. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *J. Virol.*, 2016, vol. 13: 87. doi: 10.1186/s12985-016-0544-0
31. Munster V.J., Feldmann F., Williamson B.N., van Doremalen N., Pérez-Pérez L., Schulz J., Meade-White K., Okumura A., Callison J., Brumbaugh B. Respiratory disease and virus shedding in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, vol. 585, pp. 268–272. doi: 10.1038/s41586-020-2324-7
32. Nishiura H., Linton N.M., Akhmetzhanov A.R. Initial cluster of novel coronavirus (2019-nCoV) infections in Wuhan, China is consistent with substantial human-to-human transmission. *JCM*, 2020, vol. 9, no. 2, pp. 488. doi: 10.3390/jcm9020488
33. OIE. COVID-19: Events in animals. URL: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19/> (03.10.2020)
34. Oreshkova N., Molenaar R.J., Vreman S., Harders F., Oude Munnink B.B., Hakze-van der Honing R.W., Gerhards N., Tolsma P., Bouwstra R., Sikkema R.S., Tacken M.G., de Rooij M.M., Weesendorp E., Engelsma M.Y., Brusckke C.J., Smit L.A., Koopmans M., van der Poel W.H., Stegeman A. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill.*, 2020, vol. 25, no. 23: 2001005. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005
35. Patel A., Jernigan D.B.; 2019-nCoV CDC Response Team. Initial public health response and interim clinical guidance for the 2019 novel coronavirus outbreak — United States. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.*, 2020, vol. 69, no. 5, pp. 140–146. doi: 10.1111/ajt.15805
36. Ramadan N., Shaib H. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): a review. *Germs.*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 35–42. doi: 10.18683/germs.2019.1155
37. Ren L.L., Wang Y.M., Wu Z.Q., Xiang Z.C., Guo L., Xu T., Jiang Y.Z., Xiong Y., Li Y.J., Li H., Fan G.H., Gu X.Y., Xiao Y., Gao H., Xu J.Y., Yang F., Wang X.M., Wu C., Chen L., Liu Y.W., Liu B., Yang J., Wang X.R., Dong J., Li L., Huang C.L., Zhao J.P., Hu Y., Cheng Z.S., Liu L.L., Qian Z.H., Qin C., Jin Q., Cao B., Wang J.W. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2020, vol. 133, no. 9, pp. 1015–1024.
38. Rodriguez-Morales A.J., Bonilla-Aldana D.K., Balbin-Ramon G.J., Rabaan A.A., Sah R., Paniz-Mondolfi A., Pagliano P., Esposito S. History is repeating itself, a probable zoonotic spillover as a cause of an epidemic: the case of 2019 novel Coronavirus. *Infez. Med.*, 2020, vol. 28, no. 1, pp. 3–5.
39. Salata C., Calistri A., Parolin C., Palu G. Coronaviruses: a paradigm of new emerging zoonotic diseases. *Pathog. Dis.*, 2019, vol. 77, no. 9: ftaa006. doi: 10/1093/femspd/ftaa006
40. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C., Huang B., Liu R., He X., Shuai L., Sun Z., Zhao Y., Liu P., Liang L., Cui P., Wang J., Zhang X., Guan Y., Tan W., Wu G., Chen H., Bu Z. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 2020, vol. 368, no. 6494, pp. 1016–1020. doi: 10.1126/science.abb7015
41. Stout A.E., André N.M., Jaimes J.A., Millet J.K., Whittaker G.R. Coronaviruses in cats and other companion animals: where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit? *Vet. Microbiol.*, 2020, vol. 247: 108777. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108777
42. Su S., Wong G., Shi W., Liu J., Lai A.C.K., Zhou J., Liu W., Bi Y., Gao G.F. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.*, 2016, vol. 24, no. 6, pp. 490–502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003
43. Tang X.C., Zhang J.X., Zhang S.Y., Wang P., Fan X.H., Li L.F., Li G., Dong B.Q., Liu W., Cheung C.L., Xu K.M., Song W.J., Vijaykrishna D., Poon L.L., Peiris J.S., Smith G.J., Chen H., Guan Y. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 15, pp. 7481–7490. doi: 10.1128/JVI.00697-06
44. Tiwari R., Dhama K., Sharun K., Iqbal Yattoo M., Malik Y.S., Singh R., Michalak I., Sah R., Bonilla-Aldana D.K., Rodriguez-Morales A.J. COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links. *Vet. Q.*, 2020, vol. 40, no. 1, pp. 169–182. doi: 10.1080/01652176.2020.1766725
45. Wang N., Li S.Y., Yang X.L., Huang H.M., Zhang Y.J., Guo H., Luo C.M., Miller M., Zhu G., Chmura A.A. Serological evidence of bat SARS-related coronavirus infection in humans, China. *Virol. Sin.*, 2018, vol. 33, pp. 104–107. doi: 10.1007/s12250-018-0012-7
46. Wang W., Tang J., Wei F. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 4, pp. 441–447. doi: 10.1002/jmv.25689
47. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, vol. 579, no. 7798, pp. 265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3

# FeLV-ИНФЕКЦИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ И ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗА КОШЕК

Т.В. Москвина<sup>1,2</sup>, М.Ю. Щелканов<sup>1,2,3</sup>, А.В. Цыбульский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> ФНИЦ биоразнообразия наземной биоты ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Обзор посвящен оценке эффективности применения препаратов интерферона и индукторов его биосинтеза для лечения лейкоза кошек, а также анализу методических подходов для повышения эффективности методов интерферонотерапии. Лейкоз кошачьих — это системное злокачественное заболевание крови вирусной природы, заканчивающееся летальным исходом в сроки примерно до 3 лет после инфицирования. Этиологическим агентом, вызывающим это заболевание, является одноцепочечный РНК-содержащий ретровирус — Feline leukemia virus (FeLV). FeLV широко распространен в популяциях домашних кошек всех стран, а также нередко выявляется и в крови диких кошек, в том числе — представителей редких и исчезающих видов семейства кошачьих. В некоторых регионах распространенность FeLV может быть значительной не только среди домашних кошек, но и среди диких. В настоящее время существует несколько коммерчески доступных вакцинных препаратов для защиты кошек от FeLV-инфекции: например, инактивированные цельновирионные вакцины типа Nobivac Feline 2-FeLV с адьювантом, двухадьювантная субъединичная вакцина на основе белковых антигенов возбудителя и безадьювантная векторная ДНК-вакцина. Однако ни одна из существующих вакцин не обеспечивает надежную защиту от этого вируса. Кроме того, вакцинация кошек против FeLV нередко сопряжена с развитием разнообразных осложнений воспалительного, аллергического характера, шоковых реакций и даже таких крайне серьезных побочных эффектов, как развитие вакцин-ассоциированной саркомы в месте инъекции, что некоторые авторы связывают с применением адьювантов типа солей алюминия и др. В данном обзоре представлена краткая характеристика вируса FeLV, обсуждаются элементы патогенеза ассоциированных с FeLV-инфекцией патологических состояний, а также современные технологии профилактики и лечения лейкоза кошек. Дается оценка истории и современного состояния интерферонотерапии FeLV-инфекции и связанных с ней неопластических процессов у домашних кошек и некоторых диких видов семейства кошачьих. Рассматриваются возможные мероприятия, направленные на повышение эффективности интерферонотерапии лейкоза кошек на основе применения новых препаратов рекомбинантного интерферона различных типов и подтипов, а также индукторов

## Адрес для переписки:

Москвина Татьяна Владимировна  
690088, Россия, г. Владивосток, ул. Суханова, 8,  
Дальневосточный федеральный университет.  
Тел.: 8 902 057-29-64.  
E-mail: rabchan1992@gmail.com

## Contacts:

Tatyana V. Moskvina  
690088, Russian Federation, Vladivostok, Sukhanova str., 8,  
Far-Eastern Federal University.  
Phone: +7 902 057-29-64.  
E-mail: rabchan1992@gmail.com

## Для цитирования:

Москвина Т.В., Щелканов М.Ю., Цыбульский А.В. FeLV-инфекция: проблемы и перспективы вакцинопрофилактики и интерферонотерапии лейкоза кошек // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 624–634. doi: 10.15789/2220-7619-FPA-882

## Citation:

Moskvina T.V., Shchelkanov M.Yu., Tsybul'ski A.V. FeLV-infection: problems and prospects of vaccine prevention and interferon-therapy of feline leukemia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 624–634. doi: 10.15789/2220-7619-FPA-882

18-34-00075 мол. а -Исследование состояния системы интерферона у домашних кошек с сочетанной ретро- и парвовирусной патологией и различными экто- и эндопаразитами и разработка эффективных программ интерферонотерапии сочетанных вирусно-паразитарных заболеваний кошек»  
18-29-090-060 мк -Исследование интерферонного статуса, а также уровня экспрессии генов p53 и gadd45g у животных с лейкозом и раком молочной железы при проведении экспериментальной терапии препаратами рекомбинантных интерферонов I–II–III типов и индукторами интерферона на основе двуцепочечных РНК и ДНК»  
183400075 mol. a "Study of the interferon system in domestic cats with concomitant retro- and parvovirus pathology and various ecto- and endoparasitosis, as well as development of effective programs for interferon therapy for combined viral parasitic feline diseases".  
1829090060 mk "Study of interferon status, as well as the level of p53 and gadd45g gene expression in animals with leukemia and breast cancer during experimental therapy with recombinant type I–II–III interferon preparations and double-stranded RNA and DNA-based interferon inducers".

© Москвина Т.В., Щелканов М.Ю., Цыбульский А.В., 2021

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-FPA-882>

интерферона. В заключение отмечается, что еще одним интересным и потенциально очень перспективным вариантом при определении стратегии биотерапии, связанной с модуляцией системы IFN в организме животных, пораженных FeLV-инфекцией, является применение индукторов образования эндогенного IFN.

**Ключевые слова:** лейкоз кошачьих, интерфероны, ретровирусы, противовирусная терапия, интерферонотерапия, опухоли.

## FeLV-INFECTION: PROBLEMS AND PROSPECTS OF VACCINE PREVENTION AND INTERFERON-THERAPY OF FELINE LEUKEMIA

Moskvina T.V.<sup>a,b</sup>, Shchelkanov M.Yu.<sup>a,b,c</sup>, Tsybulski A.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Far-Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Federal Scientific Centre of East Asia Terrestrial Biodiversity, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

<sup>c</sup> Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** Here, we review an overall effectiveness of interferon-based preparations and interferon biosynthesis inducers for treatment of feline leukemia, as well as development of methodological approaches to improve efficacy of interferon therapy. Feline leukemia is a systemic hematopoietic malignancy caused by a single-stranded RNA retrovirus called Feline Leukemia Virus (FeLV) that leads to lethal outcome within about 3 years after the onset. FeLV is widely distributed in population of domestic cats worldwide, being often detected in the blood of wild cats, including those of rare and endangered species. In some regions, FeLV prevalence may be high not only among domestic cats, but among wild as well. Currently, there are several commercially available vaccines to protect cats from FeLV infection (e.g., inactivated whole-virion vaccines such as Nobivac adjuvanted Feline 2-FeLV, two-adjuvant subunit vaccine FeLV-derived protein antigens as well as non-adjuvanted vector DNA vaccine). However, none of such vaccines provides durable protection. In addition, vaccination of cats against FeLV is often associated with development of diverse inflammatory, allergic and shock complications, and highly serious side effects such as developing vaccine-associated sarcoma at the injection site that some researchers connect with use of adjuvants like aluminum salts etc. We briefly describe FeLV virus, pathogenetic parameters associated with FeLV infection as well as current technologies for preventing and treating feline leukemia. A historic background and current state of interferon therapy for FeLV infection as well as associated neoplastic processes in domestic cats and some wild species are evaluated. Possible interventions aimed at improving efficiency of interferon therapy of feline leukemia based on using new recombinant interferon preparations of various types and subtypes, as well as interferon inducers are discussed. In conclusion, it is noted that another interesting and potentially highly promising option in defining strategy of biotherapy associated with modulating IFN system in FeLV-infected animals might be to use of synthetic inducers triggering endogenous IFN production.

**Key words:** feline leukemia, interferon, retroviruses, antiviral therapy, interferon therapy, tumor.

## Введение

Лейкоз кошачьих — это системное злокачественное заболевание крови вирусной природы, заканчивающееся летальным исходом в сроки примерно до 3 лет после инфицирования [16].

Этиологическим агентом, вызывающим это заболевание, является одноцепочечный РНК-содержащий ретровирус Feline leukemia virus (FeLV). Ретровирусы, многие из которых обладают канцерогенным (неопластическим) эффектом, обнаружены у большинства видов позвоночных организмов от рыб до млекопитающих [51]. Патологические состояния, развивающиеся в организме кошачьих вследствие инфицирования вирусом FeLV, являются одной из наиболее частых причин смерти кошек [55].

FeLV широко распространен в популяциях домашних кошек всех стран, а также нередко выявляется и в крови диких кошек, в том числе — представителей редких и исчезающих видов семейства кошачьих. В некоторых регио-

нах распространенность FeLV может быть значительной не только среди домашних кошек, но и среди диких.

В среднем примерно 0,5% домашних кошек инфицированы FeLV, а более 35% являются серопозитивными, т. е. имеют FeLV-специфические IgG-антитела, наличие которых указывает на имевший место контакт с антигенами возбудителя с последующим развитием противовирусного иммунитета без проявления признаков инфекции.

FeLV был впервые описан в 1964 г. шотландским исследователем Уильямом Джарретом, который, экспериментируя с заражением котят бесклеточным экстрактом лимфом, выделил вирус лейкоза кошек [21].

Заболевание некоторое время ассоциировалось исключительно с лейкемией, однако впоследствии было установлено, что начальными признаками болезни являются развитие анемии и иммуносупрессия [14], вследствие которых в организме инфицированных животных мо-

гут развиваться разнообразные патологические процессы бактериальной, вирусной, грибковой этиологии, а также различные неоплазии.

## Вакцинные препараты в борьбе с FeLV-инфекцией

Первый вакцинный препарат для защиты кошек от FeLV-инфекции был предложен в 1986 г. [33], однако до сих пор не разработана технология эффективной надежной вакцинации кошек против FeLV, что можно объяснить как ретровирусной природой этого возбудителя и характерной для этих вирусов высокой активностью процессов мутагенеза и модификации антигенной структуры, так и развитием иммунологической компрометации организма инфицированных животных.

В настоящее время существует несколько коммерчески доступных вакцинных препаратов для защиты кошек от FeLV-инфекции (например, инактивированные цельновирионные вакцины типа Nobivac Feline 2-FeLV с адьювантом, двухадьювантная субъединичная вакцина на основе белковых антигенов возбудителя и безадьювантная векторная ДНК-вакцина [44]). Однако ни одна из существующих вакцин не обеспечивает надежную защиту от этого вируса. Кроме того, вакцинация кошек против FeLV нередко сопряжена с развитием разнообразных осложнений воспалительного, аллергического характера, шоковых реакций и даже таких крайне серьезных побочных эффектов, как развитие вакцин-ассоциированной саркомы в месте инъекции, что некоторые авторы связывают с применением адьювантов типа солей алюминия и др. [38, 48].

Принято считать, что наиболее важными в плане иммуногенности и протективности являются такие антигены FeLV, как белок вируса лейкемии кошек gp70 и трансмембранный домен р15е, которые представляют собой молекулярные агенты, ответственные за развитие специфических реакций комплемент-зависимого цитолиза, антителозависимой цитотоксичности [13, 35], а также за продукцию вируснейтрализующих антител [9, 43]. Высокий титр антител против этих вирусных антигенов может определять латентное инфицирование вирусом FeLV и, как предполагают, вызывать элиминацию FeLV в организме кошек. Отмечена прямая корреляция между уровнем таких вирусспецифических гуморальных АТ и выраженностью противоопухолевой резистентности. Резистентность кошек к FeLV-инфекции существенно возрастает при титре циркулирующих в крови анти-FeLV-антител 1:32 и выше. В этих случаях кошки могут оставаться клинически здоровыми, однако в их организме вирус сохра-

няет репликативную активность и может выделяться в окружающую среду, неся угрозу заражения других животных. У кошек с клинической манифестацией FeLV-инфекции титр антивирусных антител обычно существенно ниже.

Наиболее популярным вакцинным препаратом против FeLV-инфекции в настоящее время является препарат Purevax FeLV (син. — Eurifel FeLV), производимый компаниями Merial (Франция) и Biokema S.A. (Швейцария). Это рекомбинантная ДНК-вакцина, в которой в качестве генетического вектора используется вирус оспы канареек (*Canarypox virus*), в геном которого интегрированы два гена FeLV — *gag* и *env* [58]. Такая вакцина считается более безопасной в отношении риска побочных реакций, так как не содержит никаких адьювантов. Это живая цельновирионная вакцинная конструкция на основе векторного вируса, патогенного для птиц, но не реплицирующегося в клетках [46]. Данная вакцина имеет хорошую репутацию в ветеринарных клиниках по критериям эффективности и безопасности, однако не дает надежной гарантии неразвития заболевания.

Мы предполагаем, что невысокий протективный потенциал такой вакцины обусловлен не только тем, что гены ретровируса FeLV характеризуются высоким уровнем мутабельности (что в результате приводит к соответствующим проявлениям по типу антигенного дрейфа и шифта), но и в значительной степени тем, что в качестве вектора используется именно нереплицирующийся вирус. Соответственно, ограничена по времени и силе антигенная стимуляция организма кошки, и формирующийся иммунный ответ не характеризуется достаточной напряженностью и протективностью. Более оптимальным нам кажется подход с использованием для генов FeLV генетических векторов, характеризующихся низкой патогенностью, но обладающих репликативной активностью (например, популярных в генно-инженерных технологиях аденовирусов и адено-ассоциированных вирусов). Перспективными можно назвать и работы по созданию генно-инженерных вакцин, в которых гены *env* и *gag* экспрессируются в геноме герпесвируса кошек (FHV), и другие подходы, потенциально способные значительно повысить лечебно-профилактический эффект подобных вакцинных конструкций. Предложена схема вакцинации этими рекомбинантами, приводящая к 100%-ной защите кошек от вирусной лейкемии.

Интересным является вопрос о возможности применения вакцинных препаратов в терапевтических целях — для стимуляции анти-FeLV иммунного ответа у кошек-носителей этого вируса с целью пролонгации стадии хронического течения (ремиссии) заболевания.

В исследовании Helfer-Hungerbuehlera A.K. и соавт. [17] изучался терапевтический потенциал двух вакцинных препаратов: Purevax® FeLV (Biokema S.A., Швейцария) и рекомбинантной вакцины Leucogen® (Virbac, Швейцария), содержащей оболочечные гликопротеины FeLV серотипа А, а также адъювант. Пятикратная инъекция таких вакцинных препаратов с 3–4-недельным интервалом не привела к сколь-либо значимым терапевтическим сдвигам в организме экспериментально зараженных вирусом FeLV кошек. В ряде случаев отмечалось некоторое снижение репликативной активности вируса и прирост титров антивирусных антител, однако такая вакциноterapia оказалась неспособна существенно снизить уровень виремии. Данные результаты свидетельствуют об отсутствии серьезных перспектив для терапевтического использования подобных вакцинных препаратов. Требуется дальнейшее проведение работ для получения более эффективных профилактических средств. Причем, как мы полагаем, это должны быть именно реплицирующиеся вакцинные конструкции. Контроль репликации и ее прекращение при необходимости может быть обеспечен применением лечебных противовирусных препаратов (аномальных нуклеозидов и др.), а также модуляцией системы интерферона, обусловленной применением индукторов интерферона и препаратов рекомбинантного интерферона. Данные методологические подходы, на наш взгляд, могут существенно повысить эффективность лечения лейкозов кошачьих.

### Современные методические подходы к лечению FeLV-инфекции

Лечение FeLV-инфекции представляет собой очень сложную задачу. Как любое длительно текущее тяжелое заболевание с формирующейся полиорганной недостаточностью, FeLV-инфекция требует проведения большого комплекса общеукрепляющего и симптоматического лечения для коррекции нарушенных функций почек, печени, кишечника, системы кроветворения и других органов и физиологических систем.

В отношении антивирусного и противолейкозного лечения кошек с FeLV-инфекцией в настоящее время не существует способов достижения значимых и устойчивых позитивных терапевтических результатов. Некоторую эффективность показали препараты, обладающие иммуномодулирующими свойствами (в большей степени — стимуляторы Т-лимфоцитарного звена иммунитета), что выразилось в улучшении общего состояния больных животных и снижении смертности за счет пролонгации

хронической стадии заболевания и отсрочки времени наступления бластного криза. Однако выздоровления и эрадикации ретровируса добиться при этом не удавалось. Подобные результаты мы получали, в частности, при использовании препаратов пептидных гормонов тимуса (данные не представлены).

Препараты аномальных нуклеозидов при лейкозе кошек малоэффективны и плохо переносятся животными, а лечение препаратами, обладающими свойствами ингибиторов вирусной интегразы, также показывает слабый и неустойчивый положительный результат [4, 15].

Весьма эффективными в лечении лейкоза кошек многие исследователи считают протоколы химиотерапии, основанные на сочетании винкристина, циклофосамида и преднизолона, а также схемы химиотерапии с применением L-аспарагиназы и доксорубина. В данном обзоре мы не будем подробно останавливаться на этих способах химиотерапии лейкоза кошек. С одной стороны, это протоколы, аналогичные протоколам, давно с переменным успехом используемым и в клинике онкологических заболеваний человека. С другой стороны, это терапия, сопровождающаяся большим количеством весьма серьезных побочных негативных эффектов. И самое главное, что лечебный эффект такой терапии лейкоза кошек очень ограничен. Достигается в большом проценте случаев эффект ремиссии, но длительность такого эффекта, как правило, не превышает нескольких месяцев [10]. Возникают рецидивы, устойчивые к повторным курсам полихимиотерапии, а также новые неопластические процессы различного гистогенеза.

Таким образом, имеется полная аналогия лейкозов кошачьих и подобных патологических процессов в клинической онкологии и онкогематологии человека. Причем, в отличие от клинической медицины, в ветеринарной медицине пока нет способов биотерапии рака и лейкозов животных, способных обеспечивать терапевтический эффект, сопоставимый, например, с эффективностью Иматиниба при хроническом миелолейкозе человека или с эффективностью при меланоме и некоторых формах рака препаратов моноклональных антител — модуляторов активности иммунологических чек-пойнтов — контрольных точек иммуногенеза.

### Интерфероны в практике цитокинотерапии лейкоза кошек

Большие надежды возлагались и возлагаются на технологии биотерапии лейкоза кошек, в том числе с применением препаратов цитокинов, обладающих большим спектром биологической активности — противовирусной,

иммуномодулирующей, антипролиферативной, противоопухолевой и др. [24, 36]. Наш опыт совместной работы с рядом ветеринарных клиник позволяет говорить о наличии некоторого терапевтического эффекта, например, препаратов рекомбинантных интерлейкинов IL-1 и IL-2, который выражается во временном улучшении состояния животных, повышении резистентности к вторичным инфекциям и в целом пролонгации жизни. Причем применялись рекомбинантные препараты интерлейкинов человека: соответственно, беталейкин (IL-1) и ронколейкин (IL-2). Положительный терапевтический эффект был транзиторным и отсутствовал при повторных курсах терапии. Очевидно, это является следствием иммуногенности препаратов человеческих интерлейкинов для организма кошек. В частности, IL-1 и IL-2 человека и кошки при сравнении нуклеотидной последовательности мРНК оказываются гомологичными только на 82 и 86% соответственно. Рекомбинантные, специфичные для кошек интерлейкины (IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ) и IL-2, а также ряд других цитокинов (IL-4, IL-6, IL-8, CSF, TNF $\alpha$ ) получены и предлагаются, например, компаниями Innovative Research (США), Kingfisher Biotech, Inc. (США) или Novus (США). Лечение лейкоза кошек подобными препаратами интерлейкинов на практике является дорогостоящим мероприятием и пока недостаточно проработано. Тем не менее лечение FeLV-инфекции и ассоциированных с ней патологических процессов иммунодефицитного и неопластического типа препаратами интерлейкинов, по нашему мнению, является очень перспективным направлением, которое позволит достичь серьезных успехов в лечении вирусных и онкологических заболеваний кошачьих. Например, в исследовании несколько другого профиля Jas D. и соавт. [22] при биотерапии рекомбинантным кошачьим IL-2, индуцированным вирусом оспы канареек, такой частой для кошек злокачественной опухоли, как саркома кошачьих, получены впечатляющие результаты, характеризующие значительное снижение риска рецидива и 2–3-кратную пролонгацию времени безрецидивного течения заболевания.

Учитывая тот факт, что ключевым драйвером лейкозогенеза у кошек является вирусный агент, особый интерес вызывают попытки лечения этого заболевания с помощью применения препаратов интерферона и, возможно, индукторов интерферона. Можно предположить, что эффективная интерферонотерапия принципиально позволит достичь следующих результатов:

1. положительного влияния на динамику развития заболевания: от торможения репликативной и экспрессионной активности вируса до активации механизмов эрадикации вируса и развития состояния длительной устойчивой ремиссии или даже полной санации организма;

2. поддержания более эффективного функционирования механизмов противоопухолевого иммунологического надзора и в целом эффективности иммунной системы в охране антигенно-структурного гомеостаза организма кошки;

3. индукции механизмов гибели малигнизированных клеток по апоптозному и другим механизмам.

То есть, как минимум, после проведения интерферонотерапии можно ожидать развития состояния пролонгированной в той или иной степени ремиссии. Однако для достижения таких результатов необходимо решить комплексную стратегическую проблему: получить действительно эффективные препараты и выработать оптимальную технологию их применения, а также обеспечить переносимость организмом животных этой терапии, как правило, сопровождающейся побочными эффектами вплоть до тяжелых реакций по типу «цитокинового шторма».

Применение препаратов IFN в практике лечения онкологических заболеваний имеет уже достаточно большую историю как в клинике, так и ветеринарии [35, 39, 47]. Эффективность интерферонотерапии тестировали при самых различных онкологических процессах, однако существенные терапевтические результаты достигались далеко не всегда. При ряде заболеваний, таких как меланома и системные миелолиферативные заболевания крови, результаты интерферонотерапии нередко оказывались впечатляющими [37, 39], тогда как при других вариантах злокачественных опухолей терапевтическая эффективность оказывалась незначительной или отсутствовала.

Попытки увязать интерпретацию плохой воспроизводимости и недостаточной широты спектра противоопухолевого действия IFN с его антивирусной активностью в отношении именно вирус-индуцированных процессов и опухолей с высокой иммуногенностью выглядят логичными, однако не всегда подкреплены достаточной доказательной базой. Кроме того, очень ограничен список препаратов IFN, тестированных на противоопухолевую активность. Практически в абсолютном большинстве случаев это IFN $\alpha$ 2, IFN $\beta$  и IFN $\gamma$ . При лейкозе кошачьих и ряде вирусных инфекций с высоким канцерогенным потенциалом практически монополюсно применяется препарат IFN $\omega$  [12, 13, 51], а также (ввиду ограниченности арсенала видоспецифических кошачьих препаратов IFN) проводится тестирование противоопухолевой активности препаратов человеческого IFN (опять же, IFN $\alpha$ 2, IFN $\beta$  и IFN $\gamma$ ) [7]. Авторы подобных исследований полагают, что высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей белков IFN может свидетель-

ствовать в пользу возможности преодоления видоспецифических ограничений, и в ряде экспериментов действительно был получен заметный терапевтический эффект в лечении ряда обладающих канцерогенным потенциалом вирусных инфекций [6, 11, 26]. Однако успех в подобном лечении достигался далеко не всегда. Например, Stuetzer В. и соавт. [55] не получили никакого терапевтического эффекта при лечении лейкозогенной FeLV-инфекции кошек комбинацией препаратов азидотимидина и рекомбинантного человеческого  $IFN\alpha$ . Отметим, что представление о высоком уровне гомологии интерферонов кошки и человека является необоснованным. Например, при сравнении (с использованием программ MEGA Version 7.0.26 и Blast) нуклеотидных последовательностей мРНК IFNA2 кошки и человека (NCBI Reference Sequence: NM\_001245021.1 и NM\_000605.3 соответственно) идентичность обнаруживается только на уровне 77%. Итогом может являться как недостаточная аффинность связи молекул ксеногенного IFN с соответствующими рецепторами, так и генерация иммунного ответа против эпитопов ксеногенного IFN, приводящая к полному отсутствию его эффективности, особенно при повторных курсах терапии.

Очевидно, что плохая прогнозируемость воспроизведения терапевтического результата интерферонотерапии связана и с недостаточностью изученности сигнальных путей, задействованных в различных видах биологической активности IFN. Кроме того, имеет место явный дисбаланс в изучении продуктов других структурных генов системы IFN кроме традиционно используемых в подобных экспериментах  $IFN\alpha_2$ ,  $IFN\beta_1$  и  $IFN\gamma$  [26, 28, 50].

Известно, что существует несколько классов молекул IFN, относящихся к трем типам. К I типу относятся IFN классов  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$ ,  $\omega$ , ко II типу —  $IFN\gamma$  и к III типу —  $IFN\lambda$ . Нередко внутри отдельных классов интерферонов выделяют многочисленные подклассы.

Большинство белковых продуктов этого большого семейства генов пока находится вне активно изучаемого спектра продуктов данной системы, хотя уже и имеются сообщения о некоторых особенностях действия, например,  $IFN\lambda$  [30]. В частности, описано менее выраженное общетоксическое действие [9, 29] и, по ряду сообщений, наличие заметной антипролиферативной и противоопухолевой активности этих IFN [32, 57].

Спектр доступных для практических ветеринаров фармакопейных препаратов видоспецифических кошачьих интерферонов в настоящее время неширок. В продаже имеются рекомбинантный препарат интерферона I типа  $IFN\omega$ , производимый в Европе фирмой Virbac под торговой маркой Virbagen Omega, и российский препарат

Фелиферон (также рекомбинантный препарат кошачьего  $IFN\omega$ ). Препарат имеет заметный терапевтический эффект, однако не способен привести к полному подавлению репликативной активности ретровируса и его эрадикации. При его использовании в нетерминальных стадиях FeLV-инфекции достигается снижение показателей смертности примерно на 20–30% [8].

За последнюю четверть века были клонированы многие гены системы интерферона кошачьих: в частности,  $IFN\omega_1$ –13,  $IFN\alpha$  1–3, 5, 6, 7–14 [49]. Однако к настоящему времени рекомбинантные продукты далеко не всех этих генов протестированы при вирусных и других заболеваниях кошек.

Ситуация в определенной степени схожа с текущим состоянием биотерапии препаратами интерферонов заболеваний человека. Несмотря на большое количество торговых марок рекомбинантных препаратов человеческого интерферона, в абсолютном большинстве случаев это препараты  $IFN\alpha_2$ , которые преимущественно и испытываются в клинических экспериментах. В последние годы определенные работы проводятся с рекомбинантными  $IFN\beta$  и  $IFN\gamma$ .

В ветеринарной медицине кошек практически эксклюзивно используются препараты кошачьего  $IFN\omega$  Intercat и Virbagen Omega, которые, кстати, применяются и для биотерапии ряда заболеваний собак, таких как лимфома собак, меланома, саркома, карцинома, чума собак, парвовирусная и папилломавирусная инфекции [25, 31].

Проблема адекватного выбора технологии IFN-терапии существенно усложняется наличием большого количества IFN-регулирующих и IFN-индуцибельных продуктов. Тем не менее существуют определенные критически значимые звенья в системе IFN, выявление и детальная характеристика которых исключительно важны для достижения стабильной эффективности препаратов IFN. Например, достаточно давно описана ситуация, когда не удается достигнуть развития антивирусного состояния даже при применении высоких доз IFN у мышей, генетически нокаутированных по гену Mx1 [53, 54]. Исходя из этого, можно предположить, что, например, оценка уровня экспрессии Mx1 способна служить одним из важнейших прогностических факторов для прогнозирования эффективности/неэффективности IFN-терапии по крайней мере некоторых вирусных инфекций.

В отношении противоопухолевой активности IFN (ее реализации, прогнозирования и мониторинга) подобную ключевую роль могут играть активно изучаемые в настоящее время сигнальные пути IRF и STING. Например, показано, что лиганды STING вызывают быструю регрессию ряда опухолевых образований, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией [2].

При проведении IFN-терапии онкологических больных представляется исключительно важным параллельный учет целого ряда биохимических, гематологических, иммунологических показателей, характеризующих состояние иммунной и других физиологических систем. На наш взгляд, чрезвычайно актуальной является и параллельная оценка показателей экспрессии молекулярных механизмов противоопухолевой защиты, в частности — генов-супрессоров опухолевого роста. В качестве таковых из большого количества продуктов подобных генов мы в своей работе выбрали P53 (TP53) и GADD45G. Гены этих белковых продуктов секвенированы и клонированы как у человека, так и у многих видов животных, в том числе у животных семейства кошачьих [40, 41], и роль их в канцерогенезе активно изучается в настоящее время [18, 23].

В отношении оценки значения P53 как прогностического маркера для оценки вероятной динамики развития онкологического процесса и мониторинга эффективности проводимого лечения отметим, что несмотря на большое количество научных публикаций, посвященных изучению этого многофункционального противоопухолевого «молекулярного полицейского», ситуация остается неоднозначной [58]. Например, Peller S. и соавт. [45] указывают, что частота изменений активности TP53 при онкогематологических процессах невысока (около 10–15%), а Kopikov E. и соавт. [26] обнаружили сверхэкспрессию TP53 при лейкозе в стадии бластного криза при невысоком уровне экспрессии в хронической стадии. Причем только в ряде случаев лейкозной патологии авторы обнаружили возможную связь нефункциональности высоких уровней TP53 с гиперэкспрессией MDM2 [26].

Sellmann L. и соавт также получили сходные результаты, демонстрирующие, что высокие уровни TP53 могут иметь место при более агрессивном течении хронического миелоидного лейкоза, однако высказали предположение что данный эффект связан с накоплением так называемой бета-формы мутантного TP53 [52]. Это предположение подтверждается результатами работ, в которых было показано, что при нормальном или повышенном уровне активности TP53 его функциональность может быть серьезно нарушена вследствие большого разнообразия точечных мутаций, секвестрации и неадекватных конформаций белка [5, 51, 42].

На основании подобных фактов мы предполагаем, что, несмотря на всю ценность оценки уровня экспрессии гена *p53*, этот показатель не может служить самостоятельным маркером для прогноза течения заболевания и мониторинга эффективности противоопухолевой терапии [61]. Он должен оцениваться в комбинации с другими показателями, характеризующими

состояние молекулярных механизмов противоопухолевого надзора.

В последнее время пристальное внимание исследователей привлекает изучение взаимодействий на уровне «система интерферона—P53—PD1L/PD1R». Особенно интересны результаты, демонстрирующие неоднозначность противоопухолевого действия системы IFN вследствие возможной активации молекулярных механизмов, увеличивающих эффективность уклонения опухоли от иммунологического надзора. Показано, например, что PD-L1 и PD-L2, являющиеся лигандами для контрольной точки иммунного ингибирования PD-1, могут быть индуцированы в опухолях путем воздействия IFN [11], что также приводит к уклонению от иммунитета. Garcia-Diaz A. и соавт. показали, в частности, что ось IFN $\gamma$ —JAK1/JAK2—STAT1/STAT2/STAT3—IRF1 регулирует экспрессию PD-L1 с привязкой IRF1 к его промотору. Это исследование охватывает сигнальные пути, связанные с IFN-регулирующими факторами конкретно IFN $\gamma$ , однако вероятность подобных противоположных ожидаемым эффектов нужно учитывать в каждом подобном исследовании.

В дополнение к оценке активности экспрессии *p53* мы предлагаем использовать оценку важного молекулярного регулятора клеточного цикла — гена *mGADD45G* [19], предполагая, что существенно более информативной будет одновременная оценка уровня экспрессии генов *p53* и *gadd45*. Известны три представителя семейства молекул GADD45: A, B, G. Наиболее целесообразным нам представляется исследование уровня активности GADD45G ввиду его сравнительно более выраженной ассоциации с механизмами репарации ДНК, апоптоза и антитуморогенной активности [19, 23, 34, 56, 59].

Представленные в научной литературе данные о роли экспрессии продуктов гена *gadd45* в канцерогенезе позволяют говорить о том, что этот показатель может служить одним из наиболее чувствительных тестов, позволяющих прогнозировать течение многих патологических процессов [33], в том числе онкологических, и проводить мониторинг эффективности лечения.

Можно предположить актуальность изучения модулирующей активности препаратов IFN (и его индукторов) и различных терапевтических схем с их участием на экспрессию генов *gadd45* как критерия, свидетельствующего о вероятности достижения терапевтического противоопухолевого эффекта и способного служить в качестве маркера для мониторинга оценки эффективности проводимого лечения. Целесообразность такого методологического подхода подтверждается, например, данными Huang W.S. и соавт. [20], которые устано-

вили связь цитостатической и апоптоз-стимулирующей активности алкалоида СІІ-102 (1-[4-(фуоро[2,3-*b*]-хинолин-4-иламино)фенил]этанон), выделенного из коры дерева *Camptotheca acuminata*, на клетки колоректальной карциномы с сигнальными путями, задействующими P21 и GADD45 [20].

Эффективность препаратов IFN при различных видах онкологической патологии различна, и в настоящее время не существует достоверных критериев прогноза эффективности IFN-терапии при системных и солидных вариантах онкопатологии. Ситуация осложняется большим количеством продуктов структурных генов, особенно генов IFN I типа. При этом количество IFN различных классов, протестированных на противоопухолевую и другие виды активностей, не столь значительно.

При проведении филогенетических исследований системы IFN мы обратили внимание на некоторые из продуктов этой системы, которые, на наш взгляд, могут иметь различающийся (и, возможно, существенно) спектр биологической активности.

В частности, обращает на себя внимание локализация гена IFN $\alpha$ 14 в другой филогенетической кладе в сравнении с другими интерферонами класса альфа. На наш взгляд, представленные данные дают некоторые основания для более детальной оценки антивирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активности такого сочетания препаратов рекомбинантных интерферонов — IFN $\alpha$ 14, IFN $\beta$ 1 и IFN $\gamma$ . В пользу данного методологического подхода свидетельствуют, например, результаты работы Abraham S. и соавт. [1], которые в экспериментах с заражением гуманизированных мышей вирусом HIV-1 обнаружили протективный эффект IFN $\alpha$ 14 и IFN $\beta$ 1, существенно превосходящий действие других препаратов IFN I типа. Отметим также и полученные Baldwin S.L. и соавт. [3] данные о том, что, например, IFN $\alpha$ 1–6 могут существенно различаться по антипролиферативной активности и по способности вызывать активацию механизмов апоптоза. А в работе Zhao H. и соавт. [60] при изучении антивирусной активности рекомбинантных продуктов 11 субтипов IFN $\alpha$  амурского тигра (*Panthera tigris altaica*) против вируса везикулярного стоматита, чумы собак и вируса птичьего гриппа (AIV) было показано, что IFN $\alpha$ 9 существенно превосходил другие изученные субтипы IFN $\alpha$  по таким параметрам, как ингибирование транскрипционной и экспрессионной активности вирусов. Кроме того, в этой работе был выявлен интересный факт, свидетельствующий о том, что спектр биологической активности IFN $\alpha$ 9 характеризовался более выраженной экспрессией гена *p53*, продукт которого, как известно, способен индуцировать апоптоз-

ные механизмы программируемой клеточной гибели. Авторы подчеркивают, что данное обстоятельство может свидетельствовать о вероятном более эффективном действии субтипа IFN $\alpha$ 9, направленном на элиминацию вирус-инфицированных и малигнизированных клеток.

Результаты этих работ, конечно, нельзя механически экстраполировать на проблемы, связанные с FeLV-инфекцией кошек. Тем не менее мы являемся сторонниками необходимости более широкого фронта исследований обширного семейства молекул интерферонов для выбора наиболее эффективного варианта интерферонотерапии вирусных и гематоонкологических заболеваний.

В последние годы появились работы, углубляющие представления об особенных механизмах действия IFN III типа. Например, в работе Kelm N.E. и соавт. [24] отмечена сравнительно более высокая противоопухолевая активность и менее выраженные негативные эффекты IFN $\alpha$ 1 при сравнении с другими IFN. Пристальное внимание исследователей направлено на апоптоз-стимулирующий и антитуморогенный потенциал IFN $\lambda$  [60]. Однако в настоящее время спектр терапевтической активности препаратов IFN III типа при вирусных и онкологических заболеваниях остается еще недостаточно изученным, что не позволяет четко формировать критерии назначения и оценки эффективности этих препаратов. Требуется детальное изучение механизмов действия этих IFN при различных формах патологии у человека и животных.

## Заключение

Анализ большого объема научных публикаций, посвященных применению препаратов IFN при вирусных инфекциях и онкологических процессах у животных семейства кошачьих, позволяет утверждать, что интерферонотерапия этих заболеваний (и лечение лейкозов в том числе) является многообещающим направлением биотерапии. На наш взгляд, ключевым условием для существенного прорыва в этом направлении является выполнение двух требований.

Во-первых, необходимо проведение сравнительных исследований терапевтической (в контексте данного обзора — антилейкозной) активности рекомбинантных продуктов всех структурных генов IFN I, II, III типов. Очевидно, что при разных вариантах патологического процесса требуется превалирование того или иного вида биологической активности IFN, а именно 1) ингибирования вирусной транскрипции и репликации; 2) антипролиферативного эффекта; 3) активации процессов репарации ДНК; 4) модуляции рецепторного поля иммунокомпетентных клеток для более эффективной межклеточной

кооперации; 5) индукции механизмов апоптоза и некроптоза для санации организма от вирусинфицированных и малигнизированных клеток.

Во-вторых, должны быть выработаны надежные алгоритмы для выбора того или иного способа интерферонотерапии. Очевидно, например, что при лейкозе кошек могут потребоваться значительно различающиеся технологии интерферонотерапии основного заболевания на этапе хронического течения лейкозного процесса, его активации и бластного криза. Лейкемический вариант и вариант с образованием солидных неопластических образований типа лимфом и лимфосарком также потребуют существенной коррекции биотерапевтических подходов к иммунотерапии.

Учитывая тот факт, что FeLV-индуцированные гематоонкологические процессы являются в большинстве случаев длительно развивающимися патологическими процессами, проведение работ по оптимизации технологии лечения препаратами интерферона требует применения высокоинформативных иммунологических и молекулярно-генетических тестов, характеризующих в организме больных животных состояние про-

тивовирусных и противоопухолевых механизмов. В этом плане, наряду с соответствующими методами, направленными на характеристику собственно интерфероновому статусу, мы полагаем перспективным проведение оценки экспрессионной активности некоторых генов — супрессоров опухолевого роста. В частности, одним из наиболее достоверных критериев оценки эффективности проводимой интерферонотерапии мы считаем уровень экспрессии генов *gadd45* и *p53*.

В заключение отметим также, что еще одним интересным и потенциально очень перспективным вариантом при определении стратегии биотерапии, связанной с модуляцией системы IFN в организме животных, пораженных FeLV-инфекцией, является применение индукторов образования эндогенного IFN. Современные технологии использования, например, лигандов для TLR-3, 7-9, способы активации сигнальных путей IRF и STING и т. п. представляют собой перспективные направления для поиска действительно таргетно-ориентированных эффективных подходов для достижения успехов в лечении FeLV-инфекции и ассоциированных с ней неопластических процессов.

## Список литературы/References

1. Abraham S., Choi J.G., Ortega N.M., Zhang J., Shankar P., Swamy N.M. Gene therapy with plasmids encoding IFN- $\beta$  or IFN- $\alpha$ 14 confers long-term resistance to HIV-1 in humanized mice. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, pp. 78412–78420. doi: 10.18632/oncotarget.12512
2. Baird J.R., Feng Z., Xiao H.D., Friedman D., Cottam B., Fox B.A., Kramer G., Leidner R.S., Bell R.B., Young K.H., Crittenden M.R., Gough M.J. STING expression and response to treatment with STING ligands in premalignant and malignant disease. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 2: e0192988. doi: 10.1371/journal.pone.0187532
3. Baldwin S.L., Powel T.D., Sellins K.S., Radecki S.V., Cohen J.J., Milhausen M. The biological effects of five feline IFN- $\alpha$  subtypes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004, vol. 99, pp. 153–167. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.01.012
4. Boesch A., Cattori V., Riond B., Willi B., Meli M.L., Rentsch K.R., Hosie M.J., Hofmann-Lehmann R., Lutz H. Evaluation of the effect of short-term treatment with the integrase inhibitor raltegravir (Isentress™) on the course of progressive feline leukemia virus infection. *Vet. Microbiol.*, 2015, vol. 175, pp. 167–178. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.031
5. Brosh R., Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, vol. 9, pp. 701–713. doi: 10.1038/nrc2693
6. Cardellino U., Ciribilli Y., Andreotti V., Modesto P., Menichini P., Fronza G., Pellegrino C., Inga A. Transcriptional properties of feline p53 and its tumour-associated mutants: a yeast-based approach. *Mutagenesis*, 2007, vol. 22, pp. 417–423. doi: 10.1093/mutage/gem038
7. Cummins J.M., Tompkins M.B., Olsen R., Tompkins W.A., Lewis M.G. Oral use of human alpha interferon in cats. *J. Biol. Response Mod.*, 1988, vol. 7, pp. 513–523.
8. De Mari K., Maynard L., Sanquer A., Lebreux B., Eun H.M. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *Vet. Intern. Med.*, 2004, vol. 18, pp. 477–482. doi: 10.1111/j.1939-1676.2004.tb02570.x
9. De Noronha F., Grant C.K., Lutz H., Keyes A., Rouston W. Circulating levels of feline leukemia and sarcoma viruses and fibrosarcoma regression in persistently viremic cats. *Cancer Res.*, 1983, vol. 43, pp. 1663–1668.
10. Fiorito F., Cantiello A., Granato G.E., Navas L., Diffidenti C., De Martino L., Maharajan V., Olivieri F., Pagnini U., Iovane G. Clinical improvement in feline herpesvirus 1 infected cats by oral low dose of interleukin-12 plus interferon-gamma. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, vol. 48, pp. 41–47. doi: 10.1016/j.cimid.2016.07.006
11. Garcia-Diaz A., Shin D.S., Moreno B.H., Saco J., Escuin-Ordinas H., Rodriguez G.A., Zaretsky J.M., Sun L., Hugo W., Wang X., Parisi G., Saus C.P., Torrejon D.Y., Graeber T.G., Comin-Anduix B., Hu-Lieskovan S., Damschroder R., Lo R.S., Ribas A. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression. *J. Proteome Res.*, 2020, vol. 19, no. 11, pp. 4393–4397. doi: 10.1016/j.jpro.2017.04.031
12. Gil S., Leal R.O., McGahie D., Sepúlveda N., Duarte A., Niza M.M.R.E., Tavares L. Oral recombinant feline interferon-omega as an alternative immune modulation therapy in FIV positive cats: clinical and laboratory evaluation. *Res. Vet. Sci.*, 2014, vol. 96, pp. 79–85. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.11.007
13. Grant C.K., De Noronha F., Tusch C., Michalek M.T., McLane M.F. Protection of cats against progressive fibrosarcoma and persistent leukemia virus infection by vaccination with feline leukemia cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1980, vol. 65, pp. 1285–1292. doi: 10.1093/jnci/65.6.1285

14. Hartmann K. Feline leukemia virus infection. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4<sup>th</sup> ed. St. Louis, MO: Saunders/Elsevier, 2012, pp. 67–75.
15. Hartmann K. Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats. What does the current literature tell us? *J. Fel. Med. Surg.*, 2015, vol. 17, pp. 925–939. doi: 10.1177/1098612X15610676
16. Hardy W.D., McClelland A.J. Feline leukemia virus: its related diseases and control. *Vet. Clin. North Am.*, 1977, vol. 7, pp. 93–103.
17. Helfer-Hungerbuehler A.K., Widmer S., Kessler Y., Rionda B., Boretto F.S., Grest P., Lutz H., Hofmann-Lehmann R. Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. *Virus Res.*, 2015, vol. 197, pp. 137–150. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.025
18. Ishiguro H., Kimura M., Takahashi H., Tanaka T., Mizoguchi K., Takeyama H. GADD45A expression is correlated with patient prognosis in esophageal cancer. *Oncol. Lett.*, 2016, vol. 11, pp. 277–282. doi: 10.3892/ol.2015.3882
19. Hoffman B., Liebermann D.A. Gadd45 in modulation of solid tumors and leukemia. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013, vol. 793, pp. 21–33. doi: 10.1007/978-1-4614-8289-5\_2
20. Huang W.S., Kuo Y.H., Kuo H.C., Hsieh M.C., Huang C.Y., Lee K.C., Lee K.F., Shen C.H., Tung S.Y., Teng C.C. CIL-102-induced cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via upregulation of p21 and GADD45. *PLoS One*, vol. 12, no. 1: e0168989. doi: 10.1371/journal.pone.0168989
21. Jarrett O. Pathogenicity of feline leukemia virus is commonly associated with variant viruses. *Leukemia*, 1992, vol. 6, no. 3, pp. 153–154. doi: 10.1056/NEJMoa2001017
22. Jas D., Soyer C., De Fornel-Thibaud P., Oberli F., Vernes D., Guigal P.M., Poulet H., Devauchelle P. Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials Vaccinol.*, 2015, vol. 4, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.trivac.2014.11.001
23. Kaushiki M., Sha X., Bhatia R., Hoffman B., Liebermann D. Loss of stress sensor GADD45a accelerates BCR-ABL-driven leukemogenesis. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 21: 1668. doi: 10.1182/blood.V118.21.1668.1668
24. Kelm N.E., Zhu Z., Ding V.A., Xiao H., Wakefield M.R., Bai Q., Fang Y. The role of IL-29 in immunity and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2016, vol. 106, pp. 91–98. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.08.002
25. Klotz D., Baumgärtner W., Gerhäuser I. Type I interferons in the pathogenesis and treatment of canine diseases (Review). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2017, vol. 191, pp. 80–93. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.08.006
26. Kociba G.J., Garg R.C., Khan K.N.M., Reiter J.A., Chatfield R.C. Effects of orally administered interferon- $\alpha$  on the pathogenesis of feline leukaemia virus-induced erythroid aplasia. *Comp. Haematol. Intern.*, 1995, vol. 5, pp. 79–83. doi: 10.1007/BF00638923
27. Koniková E., Kusenda J. Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma*, 2003, vol. 50, pp. 31–40.
28. Lasfa A., Zloza A., Cohen-Solal K.A. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. *Drug Discov. Today*, 2016, vol. 21, pp. 167–171. doi: 10.1016/j.drudis.2015.10.021
29. Lazear H.M., Nice T.J., Diamond S. Interferon- $\lambda$ : immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immun. Rev.*, 2015, vol. 43, pp. 15–28. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.001
30. Leal R.O., Gil S., Brito M.T., McGahie D., Niza M.M., Tavares L. The use of oral recombinant feline interferon omega in two cats with type II diabetes mellitus and concurrent feline chronic gingivostomatitis syndrome. *Ir. Vet J.*, 2013, vol. 66, no. 1: 19. doi: 10.1186/2046-0481-66-19
31. Li S.F., Zhao F.R., Shao J.J., Xie Y.L., Chang H.Y., Zhang Y.G. Interferon-omega: current status in clinical applications (Review). *Int. Immunopharmacol.*, 2017, vol. 52, pp. 253–260. doi: 10.1016/j.intimp.2017.08.028
32. Li Q., Kawamura K.G., Fumilwata M., Numasaki M., Suzuki N., Shimada H., Tagawa M. Interferon- $\lambda$  induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents. *Eur. J. Cancer.*, 2010, vol. 46, pp. 180–190. doi: 10.1016/j.ejca.2009.10.002
33. Louwerens M., London C.A., Pedersen N.C., Lyons L.A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J. Vet. Intern. Med.*, 2005, vol. 19, pp. 329–335. doi: 10.1111/j.1939-1676.2005.tb02703.x
34. Magimaidas A., Madreddi P., Maifrede S., Mukherjee K., Hoffman B., Liebermann D.A. Gadd45b deficiency promotes premature senescence and skin aging. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, pp. 26935–26948. doi: 10.18632/oncotarget.8854
35. McCarty J.M., Grant C.K. Feline cytotoxic immune mechanisms against virus-associated leukemia and fibrosarcom. *Cel. Immunol.*, 1983, vol. 81, pp. 157–168. doi: 10.1016/0008-8749(83)90221-6
36. Mentlik J.A., Cohen A.D., Campbell K.S. Combination immune therapies to enhance anti-tumor responses by NK cells. *Front. Immunol.*, 2013, vol. 4: 481. doi: 10.3389/fimmu.2013.00481
37. Mocellin S., Lens M.B., Pasquali S., Pilati P., Chiarion S.V. Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2013, vol. 18, no. 6: CD008955. doi: 10.1002/14651858.CD008955.pub2
38. Moore G.E., DeSantis-Kerr A.C., Guptill L.F., Glickman N.W., Lewis H.B., Glickman L.T. Adverse events after vaccine administration in cats: 2,560 cases (2002–2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2007, vol. 231, pp. 94–100. doi: 10.2460/javma.231.1.94
39. Namikawa K., Tsutsumida A., Mizutani T., Tsuchida T., Yamazaki N. Randomized phase III trial of adjuvant therapy with locoregional interferon beta versus surgery alone in stage II/III cutaneous melanoma. Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG1309, J-FERON). *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2017, vol. 47, pp. 664–667. doi: 10.1093/jcco/hyx063
40. Oikawa T., Okuda M., Kaneko N., Watanabe M., Hiraoka H., Itamoto K., Nakaichi M., Mizuno T., Inokuma H. Cloning of the feline GADD45 cDNA and analysis of its mutation in feline lymphoma cell lines. *J. Vet. Med. Sci.*, 2006, vol. 68, pp. 297–301. doi: 10.1292/jvms.68.297
41. Okuda M., Umeda A., Sakai T., Ohashi T., Momoi Y., Youn H.Y., Watari T., Goitsuka R., Tsujimoto H., Hasegawa A. Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. *Int. J. Cancer*, 1994, vol. 58, pp. 602–607. doi: 10.1002/ijc.2910580425
42. Oren M., Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2010, vol. 2, no. 2: a001107. doi: 10.1093/jmcb/mjaa040

43. Osterhaus A., Weijer K., Uytendaele F., Knell P., Jarrett O., Akerblom L., Morein B. Serological responses in cats vaccinated with FeLV ISCOM and an inactivated FeLV vaccine. *Vaccine*, 1989, vol. 7, pp. 137–141. doi: 10.1016/0264-410X(89)90053-4
44. Patel M., Carritt K., Lane J., Jayappa H., Stahl M., Bourgeois M. Comparative Efficacy of feline leukemia virus (FeLV) inactivated whole-virus vaccine and canarypox virus-vectored vaccine during virulent FeLV challenge and immunosuppression. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2015, vol. 22, pp. 798–805. doi: 10.1128/CVI.00034-15
45. Peller S., Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Human Mutation*, 2003, vol. 21, pp. 277–284. doi: 10.1002/humu.10190
46. Poulet H., Brunet S., Boularand C., Guiot A.L., Leroy V., Tartaglia J., Minke J., Audonnet J.C., Desmettre P. Efficacy of a canarypox virus-vectored vaccine against feline leukaemia. *Vet. Rec.*, 2003, vol. 153, pp. 141–145. doi: 10.1136/vr.153.5.141
47. Regan D., Dow S. Manipulation of innate immunity for cancer therapy in dogs. *Vet. Sci.*, 2015, vol. 2, pp. 423–439. doi: 10.3390/vetsci2040423
48. Richards J., Elston T., Ford R., Gaskell R., Hartmann K., Hurley K., Lappin M., Levy J., Rodan I., Scherk M., Schultz R., Sparkes A. The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine advisory panel report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2006, vol. 229, pp. 1405–1441. doi: 10.2460/javma.229.9.1405
49. Robert-Tissot C., Rüegger V.L., Cattori V., Meli M.L., Riond B., Gomes-Keller M.A., Vöggtlin A., Wittig B., Juhls C., Hofmann-Lehmann R., Lutz H. The innate antiviral immune system of the cat: molecular tools for the measurement of its state of activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2011, vol. 143, pp. 269–281. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.06.005
50. Raymond D.P., Dickensheets H., O'Brien T.R. Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Trends Immunol.*, 2011, vol. 32, pp. 443–450. doi: 10.1016/j.it.2011.07.002
51. Rovnak J., Quackenbush S.L. Walleye dermal sarcoma virus: molecular biology and oncogenesis. *Viruses*, 2010, vol. 2, pp. 1984–1999. doi: 10.3390/v2091984
52. Sellmann L., Carpinteiro A., Nüchel H., Scholtysik R., Siemer D., Klein-Hipass L., Kube D., Dürig J., Dührsen U., Stanelle J., Küppers R. p53 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 2012, vol. 53, pp. 1282–1288. doi: 10.3109/10428194.2011.654115
53. Shin D.L., Hatesuer B., Bergmann S., Nedelko T., Schughart K. Protection from severe influenza virus infections in mice carrying the Mx1 influenza virus resistance gene strongly depends on genetic background. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, pp. 9998–10009. doi: 10.1128/JVI.01305-15
54. Staeheli P., Grob R., Meier E., Sutcliffe J.G., Haller O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, pp. 4518–4523. doi: 10.1128/MCB.8.10.4518
55. Stuetzer B., Brunner K., Lutz H., Hartmann K. A trial with 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine and human interferon- $\alpha$  in cats naturally infected with feline leukaemia virus. *J. Feline Med. Surg.*, 2013, vol. 15, pp. 667–671. doi: 10.1177/1098612X12473468
56. Tamura R.E., de Vasconcellos J.F., Sarkar D., Libermann T.A., Fisher P.B., Zerbini L.F. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.*, 2012, vol. 12, pp. 634–651. doi: 10.2174/156652412800619978
57. Tezuka Y., Endo S., Matsui A., Sato A., Saito K., Semba K., Takahashi M., Murakami T. Potential anti-tumor effect of IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) against human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 2012, vol. 78, pp. 185–192. doi: 10.1016/j.lungcan.2012.09.005
58. Wardley R.C., Berlinski P.J., Thomsen D.R., Meyer A.L., Post L.E. The use of feline herpesvirus and baculovirus as vaccine vectors for the gag and env genes of feline leukaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, pp. 1811–1818. doi: 10.1099/0022-1317-73-7-1811
59. Zhang L., Yang Z., Ma A., Qu Y., Xia S., Xu D., Ge C., Qiu B., Xia Q., Li J., Liu Y. Growth arrest and DNA damage 45G down-regulation contributes to Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 activation and cellular senescence evasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2014, vol. 59, pp. 178–189. doi: 10.1002/hep.26628
60. Zhao H., Ma J., Wang Y., Liu J., Shao Y., Li J., Jiang G. Molecular cloning and functional characterization of eleven subtypes of interferon- $\alpha$  in Amur tigers (*Panthera tigris altaica*). *Dev. Comp. Immunol.* 2017, vol. 77, pp. 46–55. doi: 10.1016/j.dci.2017.07.017
61. Zorka M., Bajić V., Živković L., Kasapović J., Andjelković U., Spremo-Potparević B. Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells. *Sci. World J.*, 2014, vol. 2014, pp. 618698. doi: 10.1155/2014/618698

**Авторы:**

**Москвина Т.В.**, младший научный сотрудник лаборатории экологии микроорганизмов ДВФУ, г. Владивосток, Россия; младший научный сотрудник лаборатории вирусологии ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН, г. Владивосток, Россия;  
**Щелканов М.Ю.**, д.б.н., профессор департамента фундаментальной медицины ДВФУ, г. Владивосток, Россия; зав. лабораторией вирусологии ФНЦ биоразнообразия, г. Владивосток, Россия; директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, г. Владивосток, Россия;  
**Цыбульский А.В.**, к.б.н., доцент кафедры биохимии микробиологии и биотехнологии ДВФУ, г. Владивосток, Россия.

**Authors:**

**Moskvina T.V.**, Junior Researcher, Laboratory of Ecology of Microorganisms Far-Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Virology, FSC of Biodiversity, Vladivostok, Russian Federation;  
**Shchelkanov M.Yu.**, PhD, MD (Biology), Professor of Fundamental Medicine Department, Far-Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation; Head of the Laboratory of Virology, FSC of Biodiversity, Vladivostok, Russian Federation; Director of Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;  
**Tsybulski A.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Biochemistry and Biotechnology Department, Far-Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.12.2018  
 Отправлена на доработку 27.05.2019  
 Принята к печати 04.06.2019

Received 20.12.2018  
 Revision received 27.05.2019  
 Accepted 04.06.2019

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ВИРУСОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ВРОЖДЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.В. Васильев<sup>1,2</sup>, Н.В. Рогозина<sup>1,3</sup>, А.А. Гринева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России,  
Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Врожденные вирусные инфекционные заболевания — полиэтиологичная патология, занимающая важное место в структуре перинатальных потерь. Ввиду их широкого распространения и отсутствия специфической профилактики наибольший интерес представляет проблема герпесвирусных инфекций, а именно герпетической инфекции, вызванной вирусом простого герпеса 1 и 2 типа, герпесвирусной инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа, и цитомегаловирусной инфекции, а также парвовирусной инфекции В19. С развитием методов полногеномного секвенирования и созданием международных банков генетических данных расширились возможности изучения зависимости проявлений инфекционного процесса от молекулярно-генетических характеристик микроорганизмов. Доказано, что генетические вариации герпесвирусов могут определять их нейровирулентность, а различные генотипы цитомегаловируса ассоциированы с гепатоспленомегалией, нарушением слуха и симптомами заболеваний центральной нервной системы. Тем не менее данные о корреляции между генотипами и клиническими проявлениями все еще фрагментарны и противоречивы, а при сравнении геномных последовательностей штаммов становится очевидным чрезвычайно высокий уровень их вариабельности. Для вируса герпеса 6 типа доказана интеграция вируса в герминативные клетки с возможностью последующей вертикальной передачи хромосомно-интегрированного вируса потомству и дальнейшего его наследования от поколения к поколению. Прямая связь между различными генотипами парвовируса В19V и клиническими проявлениями заболевания, в том числе врожденного, до настоящего времени не установлена. Перспективным представляется расширение научного поиска по генотипированию вирусов простого герпеса, цитомегаловируса, вирусов герпеса 6 типа, парвовируса В19V в России с учетом возможных различий в географическом распространении этих вирусов на территории страны, этнических особенностей населения, высокой частоты вызываемых этими вирусами врожденных инфекционных

## Адрес для переписки:

Васильев Валерий Викторович  
191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9,  
ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных  
болезней ФМБА России.  
Тел.: 8 (812) 234-60-04 (служебн.), 8 921 940-93-84 (моб.).  
Факс: 8 (812) 234-96-91.  
E-mail: vcubed@ya.ru

## Contacts:

Valerii V. Vasilev  
191015, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov str., 9,  
Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases.  
Phone: +7 (812) 234-60-04 (office), +7 921 940-93-84 (mobile).  
Fax: +7 (812) 234-96-91.  
E-mail: vcubed@ya.ru

## Для цитирования:

Васильев В.В., Рогозина Н.В., Гринева А.А. Молекулярно-генетические и клинические аспекты социально значимых вирусов в реализации врожденных заболеваний // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 635–648. doi: 10.15789/2220-7619-MGA-1729

## Citation:

Vasilev V.V., Rogozina N.V., Grineva A.A. Molecular genetic and clinical aspects of socially relevant viruses underlying congenital diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 635–648. doi: 10.15789/2220-7619-MGA-1729

Статья подготовлена при финансовой поддержке гранта РФФИ по реализации научного проекта № 20-115-50439 «Экспансия».

The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research within research project No. 20-115-50439 "Expansion".

заболеваний с широким спектром клинических проявлений. Результаты этих поисков будут востребованы практическим здравоохранением для разработки и применения более эффективных этиотропных препаратов и средств специфической профилактики с учетом тенденций развития персонифицированной и превентивной медицины.

**Ключевые слова:** врожденные инфекции, внутриутробные инфекции, беременность, дети, новорожденные, антенатальная смертность, неонатальная смертность, вирус простого герпеса 1 типа, вирус простого герпеса 2 типа, вирус герпеса человека 6 типа, цитомегаловирус, парвовирус В19.

## MOLECULAR GENETIC AND CLINICAL ASPECTS OF SOCIALLY RELEVANT VIRUSES UNDERLYING CONGENITAL DISEASES

Vasilev V.V.<sup>a,b</sup>, Rogozina N.V.<sup>a,c</sup>, Grineva A.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Congenital viral infectious diseases are characterized by polyetiologic pathology holding an important place in the structure of perinatal losses. Due to the wide distribution and lack of specific prophylaxis, the problem of herpesvirus infections is of greatest interest, namely of herpes infection caused by herpes simplex virus type 1 and 2, human herpes simplex virus type 6 and cytomegalovirus infection, as well as parvovirus infection B19. The opportunities to investigate a relation between manifestations of the infectious process and host molecular genetic characteristics have been expanded after developing full genome sequencing methods and creating genetic data international banks. It has been proven that herpes virus genetic variations can account for related neurovirulence, showing that diverse cytomegalovirus genotypes are associated with hepatosplenomegaly, hearing impairment and the symptoms of the central nervous system diseases. Nevertheless, the data on correlation between genotypes and clinical manifestations are still scarce and contradictory, whereas high level of variability becomes extremely evident while comparing genomic sequences of viral strains. The herpesvirus type 6 has been proven to integrate into germ cells with potential for subsequent vertical transmission of chromosomally integrated virus to the offspring and its further intergeneration inheritance. A direct relationship between B19V genospecies and disease manifestations including congenital infections has not yet been identified. Taking into account possible differences in the geographical distribution of such viruses on the territory of the Russian Federation, ethnic populational characteristics, and high frequency of related congenital infectious diseases with a wide range of clinical manifestations, it seems promising to expand scientific research on the genotyping of herpes simplex viruses, cytomegalovirus, herpes viruses type 6 and parvovirus B19V in Russia. The results of such studies will be demanded by practical healthcare in order to develop and use more effective etiotropic drugs and specific prophylaxis in the light of trends to develop personalized and preventive medicine.

**Key words:** congenital infections, intrauterine infections, pregnancy, children, newborns, antenatal mortality, neonatal mortality, herpes simplex virus 1, herpes simplex virus 2, human herpes virus 6, cytomegalovirus, parvovirus B19.

## Введение

Актуальность проблемы врожденных вирусных инфекционных заболеваний обусловлена повсеместным распространением, высокой частотой (от 25% от числа живорожденных до 50% и более в структуре всех перинатальных потерь), значительным экономическим ущербом, связанным с затратами на диагностику, лечение и реабилитацию, а также высоким социальным бременем [3, 11].

Врожденные инфекционные заболевания (далее — ВИЗ) вызываются более чем 50 различными агентами вирусной, бактериальной, протозойной, грибковой природы. Частота вызываемой ими патологии не одинакова: преобладают вирусные инфекции и их сочетания. Так, антенатальная смертность при врожденных вирусных инфекциях достигает 27%, в то

время как при бактериальных инфекциях этот показатель не превышает 17% [1, 2, 3]. В настоящее время все большую актуальность приобретает проблема вирусных инфекций, возбудители которых могут быть переданы от матери плоду, в частности вирусы семейства герпесвирусов [цитомегаловирус (ЦМВ), вирусы герпеса человека 6 и 7 типов (ВГЧ-6 и ВГЧ-7)], а также парвовирус В19 (ПВ В19) [47].

До сих пор остается неясным, почему одни и те же инфекционные агенты в одном случае вызывают тяжелое поражение плода или невынашивание беременности, а в другом — практически не влияют на ее течение. В возникновении ВИЗ решающую роль играют биологические свойства возбудителя — его патогенность и вирулентность. Характер патологии плода зависит также от степени выраженности и характера индуцированных возбудителями измене-

ний в иммунной системе беременной. Особое значение имеют индивидуальная восприимчивость и резистентность к инфекциям [22].

К социально значимым и опасным для окружающих заболеваниям вирусной природы принято относить ВИЧ-инфекцию, вирусные гепатиты В и С, вирусные лихорадки, передаваемые членистоногими, вирусные геморрагические лихорадки, аногенитальную герпетическую инфекцию, вызванную вирусом простого герпеса 2 типа [12]. В то же время с точки зрения современной проблемы профилактики ВИЗ из этого перечня наибольшее значение для нашей страны имеют ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты и инфекция, вызванная вирусом простого герпеса (ВПГ).

Успехи в изучении вопросов профилактики перинатальной передачи ВИЧ и вирусного гепатита С, а также широкое внедрение вакцинации от гепатита В в значительной степени снизили частоту указанной патологии. Ввиду широкого распространения и отсутствия специфической профилактики наибольший интерес представляют герпесвирусные инфекции — герпетическая инфекция, вызванная ВПГ 1, 2 типа, герпесвирусная инфекция, вызванная ВГЧ-6, и цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ), — являющиеся одной из ведущих причин ВИЗ, а также парвовирусная инфекция В19 (ПВИ В19).

В последние десятилетия, с развитием методов полногеномного секвенирования и созданием международных банков генетических данных, все больший интерес вызывает изучение возможной зависимости проявлений инфекционного процесса, в том числе при ВИЗ, от молекулярно-генетических характеристик микроорганизмов.

Цель обзора — обобщение современных представлений о взаимосвязи генетических особенностей некоторых широко распространенных вирусов (ВПГ 1 и 2 типов, ЦМВ, ВГЧ-6, ПВ В19V) и клинико-эпидемиологических аспектов вызываемых ими врожденных инфекционных заболеваний.

Поиск информации был проведен в англо- и русскоязычных базах данных (Medline, PubMed, Scopus, Web of Science, Cochrane Library, Elibrary и др.), глубина поиска — 15 лет (также приведены также ссылки на более ранние исследования, имеющие фундаментальное значение). При поиске использовались следующие ключевые слова: врожденные инфекции, внутриутробные инфекции, беременность, дети, новорожденные, задержка внутриутробного развития, гибель плода, антенатальная смертность, неонатальная смертность, вирус простого герпеса 1, 2 типа, вирус герпеса человека 6 типа, цитомегаловирус, парвовирус В19.

В настоящее время известно девять типов вирусов герпеса, патогенных для человека. Все они имеют общий жизненный цикл классического герпесвируса, вызывая первичную инфекцию (обычно в детстве) и далее латентный период, который сменяется реактивацией вирусов при «снижении» иммунитета, в том числе для продолжения заражения новых хозяев. Среди вирусов герпеса выделяют три подсемейства: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* и *Gammapherpesvirinae*. Герпесвирусы человека имеют геномы различного размера (приблизительно от 125 000 до 235 000 пар оснований в длину), обладают клеточным (лимфоциты) и тканевым (эпителиальная ткань) тропизмом, а некоторые напрямую связаны с развитием конкретных заболеваний (лимфома Беркитта, инфекционный мононуклеоз, ветряная оспа).

## Вирус простого герпеса 1, 2 типа

Ранние исследования выявили генетические факторы, которые влияют на вирулентность ряда вирусов: реовирусов, вируса гриппа, ВИЧ и др. [6, 7, 8, 9, 10]. В отличие от перечисленных РНК-вирусов, ВПГ, как предполагалось, обладал меньшим генетическим разнообразием и потенциалом варибельности вирулентности из-за его относительно стабильного ДНК-генома и долгой эволюционной истории. Предположение об ограниченной гетерогенности ВПГ было подтверждено исследованиями, в которых использовался полиморфизм длины рестрикционных фрагментов с низким разрешением или анализ одного гена для сравнения нескольких изолятов ВПГ [25, 93, 94].

Однако Rosenthal K.S. и его коллеги продемонстрировали существование генетической гетерогенности популяции ВПГ на примере инвазивной неонатальной нейроинфекции и предоставили доказательство того, что естественные генетические вариации могут влиять на нейровирулентность вируса [64]. Последующее геномное секвенирование позволило провести оценку вариаций ВПГ в масштабе всего генома и предположить, что герпесвирусы обладают штаммовым разнообразием, в том числе в пределах одного инфицированного организма [37, 86, 87].

В 2012 г. распространенность вируса простого герпеса 1 типа (далее — ВПГ-1) в мире оценивалась в 3,7 млрд человек в возрасте от 0 до 49 лет, при этом примерно 140 млн человек в возрасте от 15 до 49 лет имели генитальную ВПГ-1-инфекцию. Распространенность вируса простого герпеса (далее — ВПГ-2) тогда же оценили в 417 млн человек в возрасте от 15 до 49 лет [57].

Как ВПГ-1, так и ВПГ-2 могут приводить к развитию врожденного инфекционного заболевания. По разным оценкам, 1 из 3000–20 000 живорожденных инфицирован ВПГ [50, 51]. Широкое распространение и рост заболеваемости увеличивает риск передачи ВПГ-1,2-инфекций новорожденному.

Известно, что ВПГ может передаваться плоду тремя способами: через инфицированные половые пути, восходящим путем через разрыв амниотических оболочек и трансплацентарно [42].

Приблизительно 95% всех неонатальных ВПГ-инфекций развиваются в результате передачи вируса плоду в интранатальный или послеродовой периоды. Внутриутробный (трансплацентарный) путь инфицирования не характерен для ВПГ и встречается с частотой 1:100 000–300 000 живорожденных [50, 51]. Внутриутробная (трансплацентарная) передача ВПГ может привести к неиммунной водянке плода (в условиях рецидивирующей инфекции) или к развитию молниеносного диссеминированного заболевания в результате первичного гингивостоматита у матери [67].

Риск передачи ВПГ-инфекции зависит от типа инфекции у матери, а именно: является ли инфекция первичной или вторичной. У новорожденного, родившегося от матери с первичной генитальной ВПГ-инфекцией, риск инфицирования составляет от 25 до 60%. Риск передачи ВПГ от матери с реактивированной или вторичной инфекцией новорожденному составляет примерно 2% [51].

Другими факторами, связанными с повышенным риском передачи ВПГ плоду, являются отрицательный статус антител к ВПГ у матери, естественные роды, длительный безводный период, нарушение целостности кожного барьера [84]. Следует заметить, что более 75% новорожденных с ВПГ инфекцией рождаются от матерей, у которых в анамнезе нет данных о генитальной инфекции ВПГ, что ограничивает значимость материнского анамнеза для диагностики ВИЗ в постнатальном периоде.

Однако уже давно была замечена тенденция к увеличению частоты и тяжести неврологической патологии при поражении плода ВПГ-2 по сравнению с ВПГ-1. Это было впервые описано в небольшом исследовании Corey L. и соавт., которые показали, что у новорожденных с энцефалитом, вызванным ВПГ-2, отмечена более высокая частота судорожных приступов, структурных повреждений вещества головного мозга и аномалий развития нервной системы, чем у тех, кто инфицирован ВПГ-1 [31]. Более подробный анализ Whitley R. и соавт. показал, что среди всех младенцев, инфицированных ВПГ, инфекция ВПГ-2 приводила к статисти-

чески большей вероятности задержки развития через год после инфицирования [112, 113]. Более поздний анализ клинических исследований показал тенденцию к увеличению частоты сохранения неврологической симптоматики через год после перенесенной врожденной ВПГ-2-инфекции по сравнению с инфекцией ВПГ-1 [53]. Анализ исходов ВПГ-инфекции с поражением нервной системы показал, что среди всех пациентов только 30% инфицированных ВПГ-2 имели нормальные показатели психомоторного развития по сравнению с 60% инфицированных ВПГ-1. Однако даже при локализованных формах ВПГ-инфекции аномалии развития наблюдались только у детей с ВПГ-2-инфекцией, тогда как при ВПГ-1-инфекции у детей не было выявлено долгосрочных неврологических последствий.

Akhtar L.N. и соавт. провели исследование, в котором проанализировали генетическое и фенотипическое разнообразие ВПГ-2, выделенного у 10 инфицированных новорожденных, и обнаружили разнообразие изолятов ВПГ-2, а также выявили ассоциации между генетическими вариациями вируса и клиническими проявлениями заболевания [13]. Авторы показали, что вирусы, выделенные от новорожденных с энцефалитом, содержали варианты кодирования белков, которых не было у вирусов, вызывающих неинвазивные заболевания. Многие из этих вариаций были обнаружены в белках, которые, как известно, влияют на нейровирулентность и распространение вирусов между клетками. Так гены, кодирующие предполагаемый фактор вирулентности US8A и капсидный белок VP19C (UL38), имеют значительно более высокую вариабельность у новорожденных, чем у взрослых, по сравнению с генами, кодирующими гликопротеин С (gC; UL44). Более низкая вариабельность gC (UL44) у новорожденных может быть результатом их иммунологически наивного состояния и/или более короткой продолжительности неонатальной инфекции до момента выделения вируса.

## Цитомегаловирусная инфекция

Цитомегаловирус человека является основной причиной врожденных инфекций в развитых странах. Примерно 58,9% лиц старше 6 лет и 90,8% лиц старше 80 лет серопозитивны в отношении ЦМВ. Установлено, что глобальная распространенность ЦМВ у населения в целом составляет 83%, у женщин детородного возраста — 86%, как и у доноров крови или органов. Для каждой из этих трех групп самая высокая распространенность ЦМВ отмечена в Восточно-Средиземноморском регионе

ВОЗ — 90%, а самая низкая — в Европейском регионе ВОЗ — 66% [117]. Согласно мировым данным, от 0,2 до 2% новорожденных инфицированы ЦМВ [103].

По аналогии с другими герпесвирусами, ЦМВ характеризуется пожизненной персистенцией. Латентное течение ЦМВИ характеризуется отсутствием или низким уровнем репликации вируса и сохранением виroma в неактивной форме преимущественно в популяции CD33 и CD34 гемопозитических клеток-предшественников в костном мозге и в мононуклеарных клетках периферической крови. Реактивация латентных форм вируса, а также повторное инфицирование ЦМВ возможны в уязвимых группах, таких как пациенты с ослабленным иммунитетом, беременные женщины, новорожденные [24]. Уникальной особенностью анамнеза перинатальной ЦМВИ является возможность реализации врожденного инфекционного заболевания у ребенка, родившегося от матери с существующим иммунитетом к ЦМВ (не первичная материнская инфекция), а также при первичном заражении женщины во время беременности [26].

Врожденная ЦМВ-инфекция может привести к гибели плода или необратимым последствиям со стороны нервной системы, включая нейросенсорную тугоухость и умственную отсталость. Риск развития врожденной ЦМВИ наиболее высок в случае первичного инфицирования женщины во время беременности и составляет до 32% случаев. Реактивация латентного вируса или повторное инфицирование новым штаммом ЦМВ также может привести к внутриутробной трансмиссии ЦМВ, но с гораздо более низким риском инфицирования плода — 1,4%. Передача ЦМВ может происходить на протяжении всей беременности, хотя инфицирование в первом триместре представляет наибольший риск для развивающегося плода с точки зрения тяжести заболевания и отдаленных последствий [39, 40, 73].

Впервые цитомегалию в 1881 г. обнаружил Ribbert H. в клетках почек и паратиреоидных желез [89]. В 1956–1957 гг. Smith M., Rowe W. и Weller T. совместно изолировали вирус, впоследствии известный как «цитомегаловирус» [34, 92, 101]. В 1984 г., через 28 лет после первого выделения ЦМВ, была представлена первая последовательность цитомегаловируса человека (штамм AD169) [75]. И всего через 6 лет, в 1990 г., был опубликован первый проект генома ЦМВ — штамм AD169 (GenBank X17403) [28]. С 1990 г. было опубликовано более 300 отдельных полноразмерных геномов ЦМВ (база данных и анализа патогенных вирусов NIAID, ViPR) [82].

Еще в 2010 г. итальянские ученые высказали предположение о том, что разные штаммы ЦМВ обуславливают многообразие клинических проявлений врожденной ЦМВИ [83]. Секвенирование следующего поколения (NGS) обеспечило прогресс исследований, основанных на генотипировании одного гена или определенного набора генов. Кроме того, это позволило связать генетические особенности с различными вирусными фенотипами, например корреляцию геномных перестроек с ослаблением вируса или различными мутациями вирусного генома с устойчивостью к противовирусным препаратам и тропизмом клеток [65].

Современное генотипирование ЦМВ в основном сосредоточено на гликопротеинах оболочки вируса — gB (UL55) и gH (UL75), — которые участвуют в проникновении вируса в клетки хозяина и являются основными мишенями для нейтрализующих антител [36, 99]. В различных исследованиях была обнаружена значительная генетическая изменчивость генов ЦМВ — UL55 (gB) и UL144, — что позволило определить специфические генотипы ЦМВ для каждого из обоих генов. Генотипирование на основе UL55 или UL144 применялось для исследования эпидемиологических и клинических особенностей врожденной ЦМВИ у новорожденных [16, 60, 63, 72, 80, 88, 104, 115].

Так ученые из Нидерландов во главе с Nijman J. (2014) провели исследование, целью которого было изучение распределения генотипов цитомегаловируса UL55 и UL144 при постнатальной и врожденной ЦМВИ и оценка влияния генотипов ЦМВ на тяжесть заболевания. Кроме того, авторами была проведена оценка корреляции между распределением генотипов и вирусной нагрузкой. Классификацию изолятов ЦМВ по генотипам проводили после амплификации и секвенирования генов цитомегаловируса UL55 (gB) и UL144. Клинические данные (включая церебральные аномалии, психомоторное развитие) и вирусная нагрузка были изучены в зависимости от распределения генотипов. Объектом исследования были 58 недоношенных детей с постнатальной ЦМВИ и 13 детей с врожденной ЦМВИ. Постнатальное заболевание протекало в легкой форме у всех недоношенных новорожденных с благоприятным исходом. Дети с врожденной инфекцией болели значительно тяжелее, чем новорожденные с постнатальной инфекцией. Среди этих младенцев 77% имели симптомы при рождении, 2 из 13 умерли, а у 3 из 13 развились долгосрочные неврологические осложнения. Распределение генотипов ЦМВ было сопоставимым для постнатальной и врожденной инфекции. Генотип 1 UL55 и ге-

нотип 3 UL144 были преобладающими генотипами в обеих группах. Авторы показали, что распределение генотипов UL55 и UL144 было сходным при бессимптомной постнатальной и тяжелой врожденной ЦМВИ, что позволяет предположить, что другие факторы, а не генотипы ЦМВ (UL55 и UL144), ответственны за развитие тяжелого заболевания [76].

В то же время имеются данные, указывающие на то, что генотип gB штаммов ЦМВ может влиять на клинический исход приобретенной инфекции. Исследования, проведенные в еще 2007 г., показали, что генотип gB1 ассоциирован с гепатоспленомегалией [77, 102].

Ученые из Индии продемонстрировали связь между генотипом gB2 и проявлением нарушения слуха и симптомами заболеваний центральной нервной системы у новорожденных с врожденной и перинатальной инфекцией ЦМВ [107]. Было также показано, что генотип gB2 связан с патологией развития инфицированного плода и новорожденных (по данным ультразвукового исследования и/или магнитно-резонансной томографии), тогда как gB4 ассоциирован с более низким риском аномалий развития [107].

В Ираке были проведены исследования, в результате которых был доказан высокий уровень распространенности инфекции ЦМВИ у новорожденных, госпитализированных с симптомами ВИЗ. По данным филогенетического анализа, циркулировали три генотипа вируса: gB1, gB2 и gB3. Генотип gB4 не обнаружен. У новорожденных с врожденной манифестной ЦМВИ преобладал генотип gB3, наиболее частыми клиническими проявлениями ЦМВИ были желтуха и гепатоспленомегалия. При этом не было обнаружено связи между данным генотипом и клинической картиной [15].

Ученые из Мексики провели исследование по перинатальной ЦМВИ у недоношенных новорожденных (со сроком гестации менее 37 недель), родившихся от серопозитивных матерей. В исследование были включены 387 новорожденных и 375 матерей. Генотипирование gB использовалось для анализа генотипического сходства ЦМВИ матерей и младенцев. Методология включала исследование образцов слюны и сухих пятен крови недоношенных новорожденных еженедельно от рождения до достижения 1 месяца жизни и образцов грудного молока их матерей еженедельно в течение первого месяца лактации. Были исследованы частота ЦМВ-инфекции в контексте материнской серопозитивности и вирусных генотипов (gB), а также генотипическое сходство вируса матерей и недоношенных детей. Серопозитивность матерей составила

97,3% (365/375). Неонатальная ЦМВИ была обнаружена у 5,1% (20/387) новорожденных. Преобладающим генотипом был gB2, и этот генотип преимущественно передавался новорожденным от матерей с ЦМВИ [18].

Тем не менее данные о корреляции между генотипами ЦМВ и клиническими проявлениями ЦМВИ все еще фрагментарны и противоречивы.

Кроме того, некоторые аспекты иммунопатогенеза ЦМВИ тесно связаны со способностью вируса сохраняться в организме хозяина. Персистенция ЦМВ на протяжении всей жизни достигается за счет ряда механизмов, которые позволяют избежать гуморального и клеточного иммунных ответов хозяина [62]. В частности, в ходе своей эволюционной истории ЦМВ и герпесвирусы в целом приобрели новые кодирующие гены. К ним относятся гомологи цитокинов хозяина и их G-сопряженные рецепторы, которые часто участвуют в дупликациях и делециях в геномах ЦМВ, чтобы генерировать видоспецифические иммуномодулирующие белки. Они подрывают противовирусный иммунитет хозяина, в конечном итоге снижая иммунное распознавание патогена за счет молекулярной мимикрии и других механизмов [14, 66, 74].

Таким образом, геномы ЦМВ относительно пластичны и разнообразны с точки зрения содержания генов как на межвидовом, так и на внутривидовом уровне. Такая генетическая изменчивость в сочетании с иммунологической мимикрией, скорее всего, является ключевым элементом, лежащим в основе строгой видовой специфичности этих вирусов, а также их способности сохраняться на протяжении всей жизни с минимальными клиническими проявлениями [27]. В то же время при сравнении геномных последовательностей штаммов ЦМВ становится очевидным чрезвычайно высокий уровень их варибельности, что объясняет сложность создания анти-ЦМВ-вакцины.

## Вирусы герпеса 6 типа

В отличие от ВПГ-1 и ВПГ-2 при интеграции в геном клетки хозяина вирусов герпеса человека 6 типа (А и В) их геномы остаются в значительной степени неповрежденными. Подобный механизм дает возможность вирусу избегать иммунного ответа со стороны организма хозяина. Известно, что феномен хромосомной интеграции одинаково возможен для ВГЧ-6А и ВГЧ-6В [29, 106]. В 1993 г. Luppi M. и соавт. впервые продемонстрировали феномен присутствия полноразмерного интегрированного ВГЧ-6 или его части в ДНК свежеизолированных мононуклеарных клеток периферической крови, названный позднее хромосомной интеграцией [59].

Первоначально интеграцию генома вируса в ДНК клетки хозяина описали для трансформированных клеточных линий *in vitro* [35]. Позднее это явление было продемонстрировано и *in vivo* [17, 58]. Успешная интеграция генома ВГЧ-6А/В или его участков осуществляется благодаря гомологичной рекомбинации между повторяющимися концевыми последовательностями вирусной и клеточной ДНК в субтеломерных областях хромосом человека. Интеграция может осуществляться *de novo* и рассматривается некоторыми авторами как основной путь латенции ВГЧ-6А/В [17].

Доказано, что ВГЧ-6-инфекция *de novo* может привести к накоплению вируса в организме хозяина, интеграции в его герминативные клетки с возможностью последующей вертикальной передачи хромосомно-интегрированного вируса потомству и дальнейшим его наследованием от поколения к поколению (от одного или обоих родителей с 50%-ной вероятностью по закону Менделя на каждого новорожденного). Геном хромосомно-интегрированного вируса, переданного по наследству, в большинстве случаев содержит полный набор интактных вирусных генов и поэтому обладает способностью к экспрессии и реактивации [44, 52, 68].

Endo A. и соавт. сообщили о реактивации *in vivo* наследственного хромосомно-интегрированного ВГЧ-6А у мальчика, страдающего тяжелым комбинированным иммунодефицитом, связанным с X-хромосомой (SCID-X). При использовании методов ПЦР с обратной транскрипцией (на 2 генах ВГЧ-6 — позднем гене U60/66 и гене IE1) и секвенирования генома вируса было доказано, что реактивация интегрированного ВГЧ-6А привела к возникновению заболевания, получившего обратное развитие на фоне противовирусной терапии [41]. На сегодняшний день это первое и единственное исследование, которое дает убедительные доказательства того, что при глубокой иммуносупрессии наследственный хромосомно-интегрированный ВГЧ-6А/В может реактивироваться и приводить к развитию заболевания.

На данный момент наследуемая хромосомная интеграция описана как для ВГЧ-6А, так и ВГЧ-6В, и 1% населения мира (75 млн человек) наследует хромосомно-интегрированный ВГЧ-6А/В (хиВГЧ-6А/В) [76, 77, 78, 79]. Сегодня биологические и клинические последствия хромосомной интеграции ВГЧ-6А/В рассматриваются, с одной стороны, как возможность ложной диагностики активной инфекции, с другой стороны — как один из путей реактивации инфекционного процесса при иммунодефицитных состояниях, различных соматических и аутоиммунных заболеваниях.

Однако Pellet P.E. и соавт., обобщив результаты нескольких независимых исследований, сообщили, что наследуемый хромосомно-интегрированный ВГЧ-6А/В чаще встречается у людей с соматической патологией, чем у здоровых [81]. Для формирования соматической патологии существуют биологические предпосылки реактивации хромосомно-интегрированной ВГЧ-6А/В-инфекции [30, 79]. Установлено, что интеграция ВГЧ-6А/В может изменять транскрипцию субтеломерных генов и способствовать сокращению теломер, основная роль которых состоит в защите генетической информации [54, 109]. Интеграция ВГЧ-6А/В может происходить в разных хромосомах и характерна для определенных наций [69].

Установлена возможность коинфекции экзогенного ВГЧ-6А/В и переданного по наследству хромосомно-интегрированного ВГЧ-6А/В (эндогенного) у одного и того же пациента [78]. Показано, что у пациентов с бессимптомным хромосомно-интегрированным ВГЧ-6А/В гуморальный ответ встречается с частотой до 14%, в то время как у пациентов с клиническими проявлениями инфекции ВГЧ-6А/В и подтвержденной наследуемой хромосомной интеграцией он обнаруживался гораздо чаще (60%). Низкие титры IgG позволили исследователям предположить, что люди с хромосомно-интегрированным ВГЧ-6А/В могут иметь сниженную способность бороться с вторичной инфекцией ВГЧ-6 и легко инфицируются экзогенными штаммами ВГЧ-6, что приводит к развитию различной неврологической симптоматики. Улучшение самочувствия таких пациентов на фоне проведения противовирусной терапии подтверждает факт формирования симптомов заболевания под действием не хромосомно-интегрированного, а «дикого» штамма ВГЧ-6А/В [105].

Несмотря на то что хромосомная интеграция была открыта 25 лет назад, изучение ее для ВГЧ-6А/В остается актуальным. В России до настоящего времени не описаны случаи клинической диагностики хромосомной интеграции. Наследуемая хромосомная интеграция ВГЧ-6А/В не внесена в алгоритмы диагностики инфекции ВГЧ-6А/В. Эти вопросы, так же как и эпидемиология наследуемой хромосомно-интегрированной ВГЧ-6А/В-инфекции, являются перспективными для дальнейшего изучения.

## Парвовирусная инфекция В19V

Врожденная ПВИ В19 остается актуальной проблемой в связи с высоким уровнем (до 60%) серонегативных женщин фертильного возраста и является одной из причин перинатальных

потерь [2]. Частота вертикальной передачи вируса составляет около 30%, риск внутриутробной гибели плода в этих случаях достигает 10% [4]. Следствием поражения плода является более высокая частота выкидышей, внутриутробной гибели плода, особенно при развитии наиболее характерного проявления врожденной ПВИ В19 — неиммунной водянки. Миокардит, обусловленный прямым действием вируса на миокардиоциты плода, и геморрагические кровоизлияния в вещество головного мозга (следствие тромбоцитопении) обуславливают как антенатальную смерть, так и негативные отдаленные последствия в раннем детском возрасте [8, 20, 21, 56, 61, 110].

Парвовирус В19 был открыт в 1975 г. Cosart Y. и др. при исследовании панели образцов сыворотки крови во время скрининга доноров на вирус гепатита В. Образец сыворотки № 19 на панели В содержал вирусоподобные частицы, названные впоследствии «парвовирус В19» [32]. В 1995 г. ПВ В19 человека был отнесен к роду *Erythrovirus*, в 1999–2002 гг. выделены его основные генотипы [85].

Геном ПВ В19 линейный и состоит одноцепочечной ДНК длиной 5596 нуклеотидов (штамм J35, номер доступа в GenBank — AY386330) [116]. На сегодняшний день известны 3 генотипа парвовируса человека. Штаммы с последовательностями, идентичными прототипным штаммам В19, Au и Wi, составляют генотип 1. К генотипу 2 относятся изоляты НаАМ и К71 (прототипы А6 и LaLi), а к 3 генотипу — изоляты штаммов V9 и D91.1 [33, 95]. В соответствии с различиями нуклеотидных последовательностей геномов геновиды подразделяются на штаммы 1А, 1В, 2А, 3А и 3В. Установлено, что генотип 1 распространен в западных странах. Генотип 2 встречался в Европе до 1970-х гг. Генотип 3 регистрируется в Гане, Бразилии, Индии [49, 96, 98]. На сегодняшний день сообщается только о нескольких больных с 3-м генотипом ПВ В19 в западных странах, в том числе во Франции [90]. Таким образом, повсеместно доминирует генотип 1 ПВ В19.

Биологические свойства трех генотипов В19V схожи. Степень различий в геноме колеблется от 2 до 12%, что не является значимым с точки зрения формирования иммунного ответа, так как при серотипировании все штаммы относятся к одному серотипу ПВ В19 [19, 38, 70, 11, 114]. Существует мнение, что клинические особенности ПВИ В19, вызванной вторым и третьим генотипами, аналогичны наблюдаемым при инфекции, обусловленной генотипом 1 В19V [19, 38, 70].

Однако индийские ученые под руководством Jain P. провели исследование клинико-

генетических особенностей ПВ В19 у пациентов с серповидноклеточной анемией и талассемией и группой здоровых доноров (всего 94 человека). Методы исследования включали иммуноферментный анализ с определением анти-В19V IgG и количественную ПЦР-диагностику с генотипированием вируса. Виремия ПВ В19 была зарегистрирована у 19,1% пациентов. Все доноры оказались здоровыми. Серопозитивность в отношении ПВИ В19 составила 55,3% у больных и 57,4% у доноров. На основании геномного секвенирования у пациентов были выделены изоляты, которые классифицировались как генотип 1 и субгенотип 1А. Выявлено, что генотип 2 связан с более тяжелыми нарушениями сердечной функции по сравнению с генотипом 1 [48]. Однако взаимосвязь между геновидами В19V и такими проявлениями заболевания до настоящего времени не установлена [100].

Несмотря на генетическую разнородность возбудителя, клиническая картина заболевания сходная для разных штаммов ПВ В19, как в отсутствие беременности, так и при ее наличии, а последствия приобретенной инфекции для плода идентичны [10, 19, 114].

## Заключение

Проведенный анализ показывает, что вирусы, широко распространенные в популяции человека и являющиеся основными этиологическими агентами врожденных инфекционных заболеваний, обладают различной степенью генетической гетерогенности, имеющей определенное значение в клинической практике как с точки зрения некоторых особенностей течения и проявлений инфекционного процесса, так и с точки зрения диагностических подходов (серологическое исследование на наличие антител к антигенам вируса именно ВПГ-2 рекомендовано во Франции [97]).

Исследования по генотипированию ВПГ, ЦМВ, вирусов герпеса 6 типа, парвовируса В19V в странах СНГ и в России являются ограниченными [1, 5, 6, 7, 9]. Представляется целесообразным расширение научного поиска в этом направлении с учетом возможных различий в географическом распространении этих вирусов на территории Российской Федерации, этнических особенностей населения, высокой частоты вызываемых этими вирусами врожденных инфекционных заболеваний.

Результаты данных поисков будут востребованы практическим здравоохранением для разработки и применения более эффективных этиотропных препаратов и средств специфической профилактики с учетом тенденций развития персонифицированный и превентивной медицины.

## Список литературы/References

1. Антипова А.Ю., Хамитова И.В., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19, циркулирующих на территории Северо-Западного федерального округа // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. № 6. С. 55–61. [Antipova A.Yu., Hamitova I.V., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Bichurina M.A., Lavrent'eva I.N. Molecular genetic characteristics of parvovirus B19 isolates circulating in the Northwestern Federal District. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, no. 6, pp. 55–61. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2018-6-55-61]
2. Антипова А.Ю., Лаврентьева И.Н. Вирусы семейства Parvoviridae: молекулярно-генетические аспекты репродукции и медицинская значимость // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 7–20. [Antipova A.Yu., Lavrent'eva I.N. Viruses of the Parvoviridae family: molecular genetic aspects of reproduction and medical significance. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 7–20. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-7-20]
3. Володин Н.Н. Актуальные проблемы неонатологии. М.: ГЭОТАР-Мед, 2004. 448 с. [Volodin N.N. Actual problems of neonatology. Moscow: GEOTAR-Med, 2004. 448 p. (In Russ.)]
4. Гринева А.А., Васильев В.В., Каштанова Т.А., Кянксеп И.В. Антенатальная диагностика и терапия врожденной инфекции, вызванной парвовирусом В19 (клинический случай) // Журнал инфектологии. 2020. Т. 12, № 4. С. 109–113. [Grineva A.A., Vasilev V.V., Kashtanova T.A., Kyanksep I.V. Antenatal diagnosis and therapy of congenital infection caused by parvovirus B19 (clinical case). *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2020, vol. 12, no. 4, pp. 109–113. (In Russ.) doi: 10.22625/2072-6732-2020-12-4-109-113]
5. Ермолович М.А., Семейко Г.В., Самойлович Е.О. Генетические варианты парвовируса В19, циркулирующие в Беларуси в течение эпидемического цикла инфекции (2005–2016) // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2019. Т. 16, № 1. С. 35–45. [Ermolovich M.A., Semejko G.V., Samojlovich E.O. Genetic variants of parvovirus B19 circulating in Belarus during the epidemic cycle of infection (2005–2016). *Izvestia Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = News of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Science Series*, 2019, vol. 16, no. 1, pp. 35–45. (In Russ.) doi: 10.29235/1814-6023-2019-16-1-35-45]
6. Ермолович М.А., Семейко Г.В., Самойлович Е.О. Молекулярная эпидемиология парвовирусной инфекции в Республике Беларусь // Вопросы вирусологии. 2010. Т. 55, № 2. С. 26–31. [Ermolovich M.A., Semejko G.V., Samojlovich E.O. Molecular epidemiology of parvovirus infection in the Republic of Belarus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2010, vol. 55, no. 2, pp. 26–31. (In Russ.)]
7. Ермолович М.А., Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Хрусталева В.В. Разнообразие геновариантов парвовируса В19, циркулировавших в Беларуси в 2017–2018 гг. // Медицинский журнал. 2020. № 2 (72). С. 55–60. [Ermolovich M.A., Semejko G.V., Samojlovich E.O., Hrustaleva V.V. Diversity of genovariants of parvovirus B19 circulating in Belarus in 2017–2018. *Meditsinskii zhurnal = Medical Journal*, 2020, no. 2 (72), pp. 55–60. (In Russ.)]
8. Куюмчян С.Х., Васильев В.В., Алексеева Н.П. Факторы риска и прогноз развития некоторых актуальных врожденных (внутриутробных) инфекций // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 1. С. 38–44. [Kuyumchyan S.H., Vasilev V.V., Alekseeva N.P. Risk factors and prognosis for the development of some actual congenital (intrauterine) infections. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 38–44. (In Russ.)]
9. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Семенов А.В., Бичурина М.А. Генотипирование изолятов парвовируса В19, циркулирующих в Северо-Западном федеральном округе России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 6. С. 36–43. [Lavrent'eva I.N., Antipova A.U., Semenov A.V., Bichurina M.A. Genotyping of parvovirus B19 isolates circulating in the Northwestern Federal District of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 36–43. (In Russ.)]
10. Лобзин Ю.В., Скрипченко Н.В., Васильев В.В., Рогозина Н.В., Бабаченко И.В., Левина А.С., Харит С.М., Бехтерева М.К., Рулева А.А., Сиземов А.Н., Иванова М.В., Техова И.Г., Ушакова Г.М., Осипова З.А., Голева О.В., Комарова А.М., Бухалко М.А. Диагностика, лечение и профилактика актуальных врожденных инфекций: учебное пособие для интернов, ординаторов, врачей-педиатров, врачей общей практики, инфекционистов. СПб.: СПбГПМУ, 2017. 64 с. [Lobzin Y.V., Skripchenko N.V., Vasilev V.V., Rogozina N.V., Babachenko I.V., Levina A.S., Harit S.M., Bekhtereva M.K., Ruleva A.A., Sizemov A.N., Ivanova M.V., Tekhova I.G., Ushakova G.M., Osipova Z.A., Goleva O.V., Komarova A.M., Buhalko M.A. Diagnostics, treatment and prevention of actual congenital infections: a textbook for interns, residents, pediatricians, general practitioners, infectious disease specialists. St. Petersburg: St. Petersburg State Pediatric Medical University, 2017. 64 p. (In Russ.)]
11. Неонатология: национальное руководство. Под ред. Н.Н. Володиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 896 с. [Neonatology: a national guide. Ed. by N.N. Volodin. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 896 p. (In Russ.)]
12. Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 13.07.2012 № 710, от 31.01.2020 № 66): постановление Правительства РФ № 715 от 01.12.2004 г. [On approval of the list of socially significant diseases and the list of diseases that pose a danger to others (as amended by decrees of the Government of the Russian Federation of 13.07.2012 No. 710, of 31.01.2020 no. 66): decree of the Government of the Russian Federation No. 715 of 01.12.2004. (In Russ.) URL: <http://government.ru/docs/all/50614>
13. Akhtar L.N., Bowen C.D., Renner D.W., Pandey U., Della Fera A.N., Kimberlin D.W., Prichard M.N., Whitley R.J., Weitzman M.D., Szpara M.L. Genotypic and phenotypic diversity of herpes simplex virus 2 within the infected neonatal population. *mSphere*, 2019, vol. 4, no. 1: e00590-18. doi: 10.1128/mSphere.00590-18
14. Alcami A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat. Rev.*, 2003, vol. 3, no. 1, pp. 36–50. doi: 10.1038/nri980

15. Alwan S.N., Shamran H.A., Ghaib A.H., Kadhim H.S., Al-Mayah Q.S., Al-Saffar A.J., Bayati A.H., Arif H.S., Fu J., Wickes B.L. Genotyping of Cytomegalovirus from symptomatic infected neonates in Iraq. *AJTTHAB*, 2019, vol. 100, no. 4, pp. 957–963. doi: 10.4269/ajtmh.18-0152
16. Arav-Boger R., Willoughby R.E., Pass R.F., Zong J.C., Jang W.J., Alcendor D., Hayward G.S. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease. *J. Infect. Dis.*, 2002, vol. 186, no. 8, pp. 1057–1064. doi: 10.1086/344238
17. Arbuckle J.H., Medveczky M.M., Luka J., Hadley S.H., Luegmayer A., Ablashi D., Lund T.C., Tolar J., De Meirleir K., Montoya J.G., Komaroff A.L., Ambros P.F., Medveczky P.G. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 12, pp. 5563–5568. doi: 10.1073/pnas.0913586107
18. Arellano-Galindo J., Villanueva-García D., Cruz-Ramírez J.L., Yalaupari-Mejía J.P., Uribe-Gutiérrez G., Velázquez-Guadarrama N., Nava-Frias M., Muñoz-Hernández O., Mejía-Arangure J.M. Detection and gB genotyping of CMV in Mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *JIDC*, 2014, vol. 8, no. 6, pp. 758–767. doi: 10.3855/jidc.3501
19. Attwood L.O., Holmes N.E., Hui L. Identification and management of congenital parvovirus B19 infection. *Prenat. Diagn.*, 2020, vol. 40, no. 13, pp. 1722–1731. doi: 10.1002/pd.5819
20. Barlinn R., Trogstad L., Rollag H., Frøen F., Magnus P., Dudman S.G. Parvovirus B19 DNAemia in pregnant women in relation to perinatal death: a nested case-control study within a large population-based pregnancy cohort. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2020, vol. 99, no. 7, pp. 856–864. doi: 10.1111/aogs.13801
21. Bascietto F., Liberati M., Murgano D., Buca D., Iacovelli A., Flacco M.E., Manzoli L., Familiari A., Scambia G., D'Antonio F. Outcome of fetuses with congenital parvovirus B19 infection: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 2018, vol. 52, no. 5, pp. 569–576. doi: 10.1002/uog.19092
22. Belanger B.G., Lui F. Embryology, teratology TORCH. In: Treasure Island (FL). *StatPearls Publishing*, 2019. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545148/>
23. Bell A.J., Gallagher A., Mottram T., Lake A., Kane E.V., Lightfoot T., Roman E., Jarrett R.F. Germ-line transmitted, chromosomally integrated HHV-6 and classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 11: e112642. doi: 10.1371/journal.pone.0112642
24. Boeckh M., Geballe A.P. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Investig.*, 2011, vol. 121, no. 5, pp. 1673–1680. doi: 10.1172/JCI45449
25. Bowden R., Sakaoka H., Ward R., Donnelly P. Patterns of Eurasian HSV-1 molecular diversity and inferences of human migrations. *Infect. Genet. Evol.*, 2006, vol. 6, no. 1, pp. 63–74. doi: 10.1016/j.meegid.2005.01.004.20–22
26. Britt W.J. Human cytomegalovirus infection in women with preexisting immunity: sources of infection and mechanisms of infection in the presence of antiviral immunity. *J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 221, no. 1, pp. S1–S8. doi: 10.1093/infdis/jiz464
27. Cagliani R., Forni D., Mozzi A., Sironi M. Evolution and genetic diversity of primate cytomegaloviruses. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 5: 624. doi: 10.3390/microorganisms8050624
28. Chee M.S., Bankier A.T., Beck S., Bohni R., Brown C.M., Cerny R., Horsnell T., Hutchison C.A. 3<sup>rd</sup>, Kouzarides T., Martignetti J.A., Barrell B.G. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1990, no. 154, pp. 125–69. doi: 10.1007/978-3-642-74980-3\_6
29. Chou S.W., Scott K.M. Rises in antibody to human herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay in transplant recipients with primary cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 5, pp. 851–854. doi: 10.1128/JCM.28.5.851-854.1990
30. Clark D.A. Clinical and laboratory features of human herpesvirus 6 chromosomal integration. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, vol. 22, no. 4, pp. 333–339. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.022
31. Corey L., Whitley R.J., Stone E.F., Mohan K. Difference between herpes simplex virus type 1 and type 2 neonatal encephalitis in neurological outcome. *Lancet*, 1988, vol. 331, no. 8575–8576, pp. 1–4. doi: 10.1016/s0140-6736(88)90997-x
32. Cossart Y.E., Field A.M., Cant B., Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*, 1975, vol. 305, no. 7898, pp. 72–73. doi: 10.1016/s0140-6736(75)91074-0
33. Cotmore S.F., Agbandje-McKenna M., Canuti M., Chiorini J.A., Eis-Hubinger A.M., Hughes J., Mietzsch M., Modha S., Ogliastro M., Péntzes J.J., Pintel D.J., Qiu J., Soderlund-Venermo M., Tattersall P., Tijssen P.; ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.*, 2019, vol. 100, no. 3, pp. 367–368. doi: 10.1099/jgv.0.001212
34. Craig J.M., MaCauley J.C., Weller T.H., Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *SEBM*, 1957, vol. 94, no. 1, pp. 4–12. doi: 10.3181/00379727-94-22841
35. Daibata M., Taguchi T., Taguchi H., Miyoshi I. Integration of human herpesvirus 6 in a Burkitt's lymphoma cell line. *Br. J. Haematol.*, 1998, vol. 102, no. 5, pp. 1307–1313. doi: 10.1046/j.1365-2141.1998.00903.x
36. De Vries J.J., Wessels E., Korver A.M., van der Eijk A.A., Rusman L.G., Kroes A.C., Vossen A.C. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 2, pp. 232–237. doi: 10.1128/JCM.05253-11
37. Depledge D.P., Kundu S., Jensen N.J., Gray E.R., Jones M., Steinberg S., Gershon A., Kinchington P.R., Schmid D.S., Balloux F., Nichols R.A., Breuer J. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. *Mol. Biol. Evol.*, 2014, vol. 31, no. 2, pp. 397–409. doi: 10.1093/molbev/mst210.27
38. Ekman A., Hokynar K., Kakkola L., Kantola K., Hedman L., Bondén H., Gessner M., Aberham C., Norja P., Miettinen S., Hedman K., Söderlund-Venermo M. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 13, pp. 6927–6935. doi: 10.1128/JVI.02713-06
39. Emery V.C., Lazzarotto T. Cytomegalovirus in pregnancy and the neonate. *F1000Research*, 2017, vol. 6: 138. doi: 10.12688/f1000research.10276.1
40. Enders G., Daiminger A., Bäder U., Exler S., Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J. Clin. Virol.*, 2011, vol. 52, no. 3, pp. 244–246. doi: 10.1016/j.jcv.2011.07.005

41. Endo A., Watanabe K., Ohye T., Suzuki K., Matsubara T., Shimizu N., Kurahashi H., Yoshikawa T., Katano H., Inoue N., Imai K., Takagi M., Morio T., Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, vol. 59, no. 4, pp. 545–548. doi: 10.1093/cid/ciu323
42. Fernandes N.D., Arya K., Ward R. Congenital Herpes Simplex. In: Treasure Island (FL). StatPearls Publishing, 2021. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507897>
43. Fields B.N., Byers K. The genetic basis of viral virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 1983, vol. 303, no. 1114, pp. 209–218.
44. Godet A.N., Soignon G., Koubi H., Bonnafous P., Agut H., Poirot C., Gautheret-Dejean A. Presence of HHV-6 genome in spermatozoa in a context of couples with low fertility: what type of infection? *Andrologia*, 2015, vol. 47, no. 5, pp. 531–535. doi: 10.1111/and.12299
45. Gonzalez-Scarano F., Beaty B., Sundin D., Janssen R., Endres M.J., Nathanson N. Genetic determinants of the virulence and infectivity of La Crosse virus. *Microb. Pathog.*, 1988, vol. 4, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1016/0882-4010(88)90041-1
46. Hubacek P., Hrdlickova A., Spacek M., Zajac M., Muzikova K., Sedlacek P., Cetkovsky P. Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant disease and healthy donors in the Czech Republic. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 87–90. doi: 10.1007/s12223-012-0180-z
47. Jaan A., Rajnik M. TORCH Complex. In: Treasure Island (FL). StatPearls Publishing, 2020. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560528>
48. Jain P., Jain A., Khan D.N., Kumar M. Human parvovirus B19 associated dilated cardiomyopathy. *BMJ Case Reports*, 2013: bcr2013010410. doi: 10.1136/bcr-2013-010410
49. Jain P., Jain A., Prakash S., Khan D.N., Singh D.D., Kumar A., Moulik N.R., Chandra T. Prevalence and genotypic characterization of human parvovirus B19 in children with hemato-oncological disorders in North India. *J. Med. Virol.*, 2015, vol. 87, no. 2, pp. 303–309. doi: 10.1002/jmv.24028
50. James S.H., Kimberlin D.W. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. *Clinics Perinatol.*, 2015, vol. 42, no. 1, pp. 47–59. doi: 10.1016/j.clp.2014.10.005
51. James S.H., Kimberlin D.W. Neonatal herpes simplex virus infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2015, vol. 29, no. 3, pp. 391–400. doi: 10.1016/j.idc.2015.05.001
52. Kaufner B.B., Flamand L. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Curr. Opin. Virol.*, 2014, vol. 9, pp. 111–118. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.010
53. Kimberlin D.W., Lin C.Y., Jacobs R.F., Powell D.A., Frenkel L.M., Gruber W.C., Rathore M., Bradley J.S., Diaz P.S., Kumar M., Arvin A.M., Gutierrez K., Shelton M., Weiner L.B., Sleasman J.W., de Sierra T.M., Soong S.J., Kiell J., Lakeman F.D., Whitley R.J.; Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era. *Pediatrics*, 2001, vol. 108, no. 2, pp. 223–229. doi: 10.1542/peds.108.2.223
54. Kreilmeier T., Mejri D., Hauck M., Kleiter M., Holzmann K. Telomere transcripts target telomerase in human cancer cells. *Genes (Basel)*, 2016, vol. 7, no. 8: 46. doi: 10.3390/genes7080046
55. Leong H.N., Tuke P.W., Tedder R.S., Khanom A.B., Eglon R.P., Atkinson C.E., Ward K.N., Griffiths P.D., Clark D.A. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J. Med. Virol.*, 2007, vol. 79, no. 1, pp. 45–51. doi: 10.1002/jmv.20760
56. Lindenburg I.T., Smits-Wintjens V.E., van Klink J.M., Verduin E., van Kamp I.L., Walther F.J., Schonewille H., Doxiadis I.I., Kanhai H.H., van Lith J.M., van Zwet E.W., Oepkes D., Brand A., Lopriore E; LOTUS study group. Long-term neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for hemolytic disease of the fetus/newborn: the LOTUS study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2012, vol. 206, no. 2, pp. 141.e1–141.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2011.09.024
57. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M.E., Vickerman P., Newman L.M., Gottlieb S.L. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. *Lancet Glob. Health.*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. e300–e309. doi: 10.1016/s2214-109x(16)30362-x
58. Luppi M., Barozzi P., Marasca R., Torelli G. Integration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients. *Leukemia*, 1994, vol. 8, no. 1, pp. 41–45.
59. Luppi M., Marasca R., Barozzi P., Ferrari S., Ceccherini-Nelli L., Batoni G., Merelli E., Torelli G. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J. Med. Virol.*, 1993, vol. 40, no. 1, pp. 44–52. doi: 10.1002/jmv.1890400110
60. Lurain N.S., Kapell K.S., Huang D.D., Short J.A., Paintsil J., Winkfield E., Benedict C.A., Ware C.F., Bremer J.W. Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: sequence hypervariability in low-passage clinical isolates. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, no. 12, pp. 10040–10050. doi: 10.1128/JVI.73.12.10040-10050.1999
61. Maisonneuve E., Garel C., Friszer S., Pénager C., Carbonne B., Pernot F., Rozenberg F., Schnuriger A., Cortey A., Moutard M.L., Jouanne J.M. Fetal brain injury associated with parvovirus B19 congenital infection requiring intrauterine transfusion. *Fetal. Diagn. Ther.*, 2019, vol. 46, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1159/000489881
62. Manandhar T., Hò G.T., Pump W.C., Blasczyk R., Bade-Doeding C. Battle between host immune cellular responses and HCMV immune evasion. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 15: 3626. doi: 10.3390/ijms20153626
63. Manuel O., Asberg A., Pang X., Rollag H., Emery V.C., Preiksaitis J.K., Kumar D., Pescovitz M.D., Bignamini A.A., Hartmann A., Jardine A.G., Humar A. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 49, no. 8, pp. 1160–1166. doi: 10.1086/605633
64. Mao H., Rosenthal K.S. Strain-dependent structural variants of herpes simplex virus type 1 ICP34.5 determine viral plaque size, efficiency of glycoprotein processing, and viral release and neuroinvasive disease potential. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, no. 6, pp. 3409–3417. doi: 10.1128/JVI.77.6.3409-3417.2003

65. Marti-Carreras J., Maes P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes*, 2019, vol. 55, no. 2, pp. 138–164. doi: 10.1007/s11262-018-1627-3
66. McSharry B.P., Avdic S., Slobedman B. Human cytomegalovirus encoded homologs of cytokines, chemokines and their receptors: roles in immunomodulation. *Viruses*, 2012, vol. 4, no. 11, pp. 2448–2470. doi: 10.3390/v4112448
67. Mercolini F., Verdi F., Eisendle K., Messner H., Staffler A. Congenital disseminated HSV-1 infection in preterm twins after primary gingivostomatitis of the mother: case report and review of the literature. *Z. Geburtshilfe Neonatol.*, 2014, vol. 218, no. 6, pp. 261–264. doi: 10.1055/s-0034-1385854
68. Michou V., Liarmakopoulou S., Thomas D., Tsimaradou K., Makarounis K., Constantoulakis P., Angelopoulou R., Tsilivakos V. Herpes virus infected spermatozoa following density gradient centrifugation for IVF purposes. *Andrologia*, 2012, vol. 44, no. 3, pp. 174–180. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01121.x
69. Miura H., Kawamura Y., Hattori F., Kozawa K., Ihira M., Ohye T., Kurahashi H., Yoshikawa T. Chromosomally integrated human herpesvirus 6 in the Japanese population. *J. Med. Virol.*, 2018, vol. 90, no. 10, pp. 1636–1642. doi: 10.1002/jmv.25244
70. Mühlemann B., Margaryan A., Damgaard P.B., Allentoft M.E., Vinner L., Hansen A.J., Weber A., Bazaliiskii V.I., Molak M., Arneborg J., Bogdanowicz W., Falys C., Sablin M., Smrčka V., Sten S., Tashbaeva K., Lynnerup N., Sikora M., Smith D.J., Fouchier R.A.M., Drosten C., Sjögren K.G., Kristiansen K., Willerslev E., Jones T.C. Ancient human parvovirus B19 in Eurasia reveals its long-term association with humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, vol. 115, no. 29, pp. 7557–7562. doi: 10.1073/pnas.1804921115
71. Müller V., Fraser C., Herbeck J.T. A strong case for viral genetic factors in HIV virulence. *Viruses*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 204–216. doi: 10.3390/v3030204.17
72. Murayama T., Takegoshi M., Tanuma J., Eizuru Y. Analysis of human cytomegalovirus UL144 variability in low-passage clinical isolates in Japan. *Intervirology*, 2005, vol. 48, no. 2–3, pp. 201–206. doi: 10.1159/000081749
73. Mussi-Pinhata M.M., Yamamoto A.Y., Aragon D.C., Duarte G., Fowler K.B., Boppana S., Britt W.J. Seroconversion for cytomegalovirus infection during pregnancy and fetal infection in a highly seropositive population: “The brachs study”. *J. Infect. Dis.*, 2018, vol. 218, no. 8, pp. 1200–1204. doi: 10.1093/infdis/jiy321
74. Naing Z., Hamilton S.T., van Zuylen W.J., Scott G.M., Rawlinson W.D. Differential expression of PDGF receptor- $\alpha$  in human placental trophoblasts leads to different entry pathways by human cytomegalovirus strains. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1: 1082. doi: 10.1038/s41598-020-57471-3
75. Nelson J.A., Fleckenstein B., Jahn G., Galloway D.A., McDougall J.K. Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD169. *J. Virol.*, 1984, vol. 49, no. 1, pp. 109–115. doi: 10.1128/JVI.49.1.109-115.1984
76. Nijman J., Mandemaker F.S., Verboon-Macolek M.A., Aitken S.C., van Loon A.M., de Vries L.S., Schuurman R. Genotype distribution, viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 9: e108018. doi: 10.1371/journal.pone.0108018
77. Novak Z., Ross S.A., Patro R.K., Pati S.K., Kumbla R.A., Brice S., Boppana S.B. Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 3, pp. 882–886. doi: 10.1128/JCM.01079-07
78. Pantry S.N., Medveczky M.M., Arbuckle J.H., Luka J., Montoya J.G., Hu J., Renne R., Peterson D., Pritchett J.C., Ablashi D.V., Medveczky P.G. Persistent human herpesvirus-6 infection in patients with an inherited form of the virus. *J. Med. Virol.*, 2013, vol. 85, no. 11, pp. 1940–1946. doi: 10.1002/jmv.23685
79. Pantry S.N., Medveczky P.G. Latency, integration, and reactivation of human herpesvirus-6. *Viruses*, 2017, vol. 9, no. 7: 194. doi: 10.3390/v9070194
80. Paradowska E., Studzińska M., Nowakowska D., Wilczyński J., Rycel M., Suski P., Gaj Z., Kaczmarek B., Zbróg Z., Leśniowski Z.J. Distribution of UL144, US28 and UL55 genotypes in Polish newborns with congenital cytomegalovirus infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, vol. 31, no. 7, pp. 1335–1345. doi: 10.1007/s10096-011-1447-z
81. Pellett P.E., Ablashi D.V., Ambros P.F., Agut H., Caserta M.T., Descamps V., Flamand L., Gautheret-Dejean A., Hall C.B., Kamble R.T., Kuehl U., Lassner D., Lautenschlager I., Loomis K.S., Luppi M., Lusso P., Medveczky P.G., Montoya J.G., Mori Y., Ogata M., Pritchett J.C., Rogez S., Seto E., Ward K.N., Yoshikawa T., Razonable R.R. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev. Med. Virol.*, 2012, vol. 22, no. 3, pp. 144–155. doi: 10.1002/rmv.715
82. Pickett B.E., Sadat E.L., Zhang Y., Noronha J.M., Squires R.B., Hunt V., Liu M., Kumar S., Zaremba S., Gu Z., Zhou L., Larson C.N., Dietrich J., Klem E.B., Scheuermann R.H. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. D1, pp. D593–D598. doi: 10.1093/nar/gkr859
83. Pignatelli S., Lazzarotto T., Gatto M.R., Dal Monte P., Landini M.P., Faldella G., Lanari M. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, vol. 51, no. 1, pp. 33–41. doi: 10.1086/653423
84. Pinninti S.G., Kimberlin D.W. Management of neonatal herpes simplex virus infection and exposure. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 2014, vol. 99, no. 3, pp. 240–244. doi: 10.1136/archdischild-2013-303762
85. Plummer F.A., Hammond G.W., Forward K., Sekla L., Thompson L.M., Jones S.E., Kidd I.M., Anderson M.J. An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, 1985, vol. 313, no. 2, pp. 74–79. doi: 10.1056/NEJM198507113130203
86. Renner D.W., Szpara M.L. Impacts of genome-wide analyses on our understanding of human herpes-virus diversity and evolution. *J. Virol.*, 2018, vol. 92, no. 1: e00908-17. doi: 10.1128/JVI.00908-17
87. Renzette N., Gibson L., Jensen J.D., Kowalik T.F. Human cytomegalovirus intrahost evolution — a new avenue for understanding and controlling herpesvirus infections. *Curr. Opin. Virol.*, 2014, vol. 8, pp. 109–115. doi: 10.1016/j.coviro.2014.08.001.26
88. Revello M.G., Campanini G., Piralla A., Furione M., Percivalle E., Zavattoni M., Gerna G. Molecular epidemiology of primary human cytomegalovirus infection in pregnant women and their families. *J. Med. Virol.*, 2008, vol. 80, no. 8, pp. 1415–1425. doi: 10.1002/jmv.21243

89. Ribbert H. Ueber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl. Allg. Pathol.*, 1904, vol. 15, pp. 945–948.
90. Rinckel L.A., Buno B.R., Gierman T.M., Lee D.C. Discovery and analysis of a novel parvovirus B19 genotype 3 isolate in the United States. *Transfusion*, 2009, vol. 49, no. 7, pp. 1488–1492. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02160.x
91. Robinson C.M., Jesudhasan P.R., Pfeiffer J.K. Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host Microbe*, 2014, vol. 15, no. 1, pp. 36–46. doi: 10.1016/j.chom.2013.12.004.13–18
92. Rowe W.P., Hartley J.W., Waterman S., Turner H.C., Huebner R.J. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, vol. 92, no. 2, pp. 418–424. doi: 10.3181/2F00379727-92-22497
93. Sakaoka H., Kawana T., Grillner L., Aomori T., Yamiguchi T., Saito H., Fujinaga K. Genome variations in herpes simplex virus type 2 strains isolated in Japan and Sweden. *J. Gen. Virol.*, 1987, vol. 68, no. 8, pp. 2105–2116. doi: 10.1099/0022-1317-68-8-2105.21
94. Sakaoka H., Kurita K., Iida Y., Takada S., Umene K., Kim Y.T., Ren C.S., Nahmias A.J. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J. Gen. Virol.*, 1994, vol. 75, no. 3, pp. 513–527. doi: 10.1099/0022-1317-75-3-513.22
95. Salbetti M.B., Pedranti M.S., Barbero P., Molisani P., Lazzari M., Olivera N., Isa M.B., Bertoldi A., Moreno L., Adamo M.P. Molecular screening of the human parvoviruses B19 and bocavirus 1 in the study of congenital diseases as applied to symptomatic pregnant women and children. *Access Microbiol.*, 2019, vol. 1, no. 5: e000037. doi: 10.1099/acmi.0.000037
96. Sanabani S., Neto W.K., Pereira J., Sabino E.C. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 2, pp. 604–606. doi: 10.1128/JCM.44.2.604-606.2006
97. Sénat M.V., Anselem O., Picone O., Renesme L., Sananès N., Vauloup-Fellous C., Sellier Y., Laplace J.P., Sentilhes L. Prevention and management of genital herpes simplex infection during pregnancy and delivery: guidelines from the french college of gynaecologists and obstetricians (CNGOF). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2018, vol. 224, pp. 93–101. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.03.011
98. Servant A., Laperche S., Lallemand F., Marinho V., De Saint Maur G., Meritet J.F., Garbarg-Chenon A. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, no. 18, pp. 9124–9134. doi: 10.1128/jvi.76.18.9124-9134.2002
99. Sharma S., Wisner T.W., Johnson D.C., Heldwein E.E. HCMV gB shares structural and functional properties with gB proteins from other herpesviruses. *Virology*, 2013, vol. 435, no. 2, pp. 239–249. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.024
100. Slavov S.N., Kashima S., Silva-Pinto A.C., Covas D.T. Genotyping of Human parvovirus B19 among Brazilian patients with hemoglobinopathies. *Can. J. Microbiol.*, 2012, vol. 58, no. 2, pp. 200–205. doi: 10.1139/w11-119
101. Smith M.G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, vol. 92, no. 2, pp. 424–430. doi: 10.3181/00379727-92-22498
102. Sowmya P., Dhanya V., Madhavan H.N., Therese K.L. Comparative efficacy of PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) & multiplex PCR for glycoprotein B (gB) genotyping of human cytomegalovirus. *Indian J. Med. Res.*, 2007, vol. 126, no. 2, pp. 122–127.
103. Staras S.A., Dollard S.C., Radford K.W., Flanders W.D., Pass R.F., Cannon M.J. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988–1994. *Clin. Infect. Dis.*, 2006, vol. 43, no. 9, pp. 1143–1151. doi: 10.1086/508173
104. Stranska R., Schuurman R., Toet M., Verboon-Macielek M., de Vries L.S., van Loon A.M. Application of UL144 molecular typing to determine epidemiology of cytomegalovirus infections in preterm infants. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 3, pp. 1108–1110. doi: 10.1128/JCM.44.3.1108-1110.2006
105. Tanaka-Taya K., Sashihara J., Kurahashi H., Amo K., Miyagawa H., Kondo K., Okada S., Yamanishi K. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J. Med. Virol.*, 2004, vol. 73, no. 3, pp. 465–473. doi: 10.1002/jmv.20113
106. Telford M., Navarro A., Santpere G. Whole genome diversity of inherited chromosomally integrated HHV-6 derived from healthy individuals of diverse geographic origin. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 3472. doi: 10.1038/s41598-018-21645-x
107. Trincado D.E., Scott G.M., White P.A., Hunt C., Rasmussen L., Rawlinson W.D. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. *J. Med. Virol.*, 2000, vol. 61, no. 4, pp. 481–487. doi: 10.1002/1096-9071(200008)61:4<481::aidjmv11>3.0.co;2-h
108. Tscherne D.M., Garcia-Sastre A. Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *J. Clin. Investig.*, 2011, vol. 121, no. 1, pp. 6–13. doi: 10.1172/JCI44947.16
109. Wang C., Zhao L., Lu S. Role of TERRA in the regulation of telomere length. *Int. J. Biol. Sci.*, 2015, vol. 11, no. 3, pp. 316–323. doi: 10.7150/ijbs.10528
110. Waring G.J. Parvovirus B19 infection: timely diagnosis in pregnancy essential. *Case Rep. in Women's Health*, 2018, vol. 18: e00057. doi: 10.1016/j.crwh.2018.e00057
111. Warnecke J.M., Pollmann M., Borchardt-Löhöfner V., Moreira-Soto A., Kaya S., Sener A.G., Gómez-Guzmán E., Figueroa-Hernández L., Li W., Li F., Buska K., Zakaszewska K., Ziolkowska K., Janz J., Ott A., Scheper T., Meyer W. Seroprevalences of antibodies against TORCH infectious pathogens in women of childbearing age residing in Brazil, Mexico, Germany, Poland, Turkey and China. *Epidemiol. Infect.*, 2020, vol. 30, no. 148: e271. doi: 10.1017/S0950268820002629
112. Whitley R., Arvin A., Prober C., Burchett S., Corey L., Powell D., Plotkin S., Starr S., Alford C., Connor J., Jacobs R., Nahmias A., Soong S.-J. A controlled trial comparing vidarabine with acyclovir in neonatal herpes simplex virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 1991, vol. 324, no. 7, pp. 444–449. doi: 10.1056/nejm199102143240703
113. Whitley R., Arvin A., Prober C., Corey L., Burchett S., Plotkin S., Starr S., Jacobs R., Powell D., Nahmias A., Sumaya C., Edwards K., Alford C., Caddell G., Soong S.-J. Predictors of morbidity and mortality in neonates with herpes simplex virus infections. *N. Engl. J. Med.*, 1991, vol. 324, no. 7, pp. 450–454. doi: 10.1056/NEJM199102143240704

114. Xiong Y.Q., Tan J., Liu Y.M., He Q., Li L., Zou K., Sun X. The risk of maternal parvovirus B19 infection during pregnancy on fetal loss and fetal hydrops: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Virol.*, 2019, no. 114, pp. 12–20. doi: 10.1016/j.jcv.2019.03.004
115. Yan H., Koyano S., Inami Y., Yamamoto Y., Suzutani T., Mizuguchi M., Ushijima H., Kurane I., Inoue N. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch. Virol.*, 2008, vol. 153, no. 4, pp. 667–674. doi: 10.1007/s00705-008-0044-7
116. Zhi N., Zádori Z., Brown K.E., Tijssen P. Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19. *Virology*, 2004, vol. 318, no. 1, pp. 142–152. doi: 10.1016/j.virol.2003.09.011
117. Zuhair M., Smit G.S.A., Wallis G., Jabbar F., Smith C., Devleeschauwer B., Griffiths P. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.*, 2019, vol. 29, no. 3: e2034. doi: 10.1002/rmv.2034

**Авторы:**

**Васильев В.В.**, д.м.н., профессор, зав. научно-исследовательским отделом врожденных инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры инфекционных болезней, ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;  
**Рогозина Н.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела врожденных инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры инфекционных заболеваний у детей ФП и ДПО ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;  
**Гринева А.А.**, к.м.н., научный сотрудник научно-исследовательского отдела врожденных инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Vasilev V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Research Department of Congenital Infectious Diseases, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Infectious Diseases, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Rogozina N.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Congenital Infectious Diseases, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Infectious Diseases in Children, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Grineva A.A.**, PhD (Medicine), Researcher, Department of Congenital Infectious Diseases, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation.

# «СЕПСИС-3»: НОВАЯ РЕДАКЦИЯ — СТАРЫЕ ПРОБЛЕМЫ. АНАЛИЗ С ПОЗИЦИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ

Е.Ю. Гусев<sup>1</sup>, Н.В. Зотова<sup>1,2</sup>, В.А. Черешнев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Документ «Сепсис-3» («Третий международный консенсус по определению сепсиса и септического шока») дает определение сепсиса как органной дисфункции, регистрируемой с помощью шкал SOFA/quick SOFA и связанной с дисрегуляцией ответа организма на инфекцию. Фактически в медицинской практике сепсис — это не более чем критическая инфекция, требующая интенсивной терапии. Поэтому сепсис патогенетически неоднороден, включает различные нозологические и синдромальные составляющие. В отличие от двух предыдущих редакций «Сепсис-1» и «Сепсис-2», в документе «Сепсис-3» формальные критерии сепсиса более приближены к положению де-факто, характеризуются большей специфичностью, но меньшей чувствительностью для прогноза летальности. Однако начальные, латентные проявления критических состояний, которые относительно эффективно купируются интенсивной терапией, могут оставаться за рамками критериев «Сепсис-3». Также не все признаки полиорганной дисфункции (согласно критериям «Сепсис-3») будут нуждаться в купировании с помощью интенсивной терапии. Поэтому очевидно, что наличие или отсутствие формальных критериев «Сепсис-3» не всегда будет учитываться при верификации сепсиса. Патогенетически относительно однородная дефиниция в «Сепсис-3» — это «септический шок». Однако и она не в полной степени учитывает стадийность (по степени компенсации нарушений гемодинамики) и фазность (по степени выраженности провоспалительного ответа) динамики шокового состояния. С нашей точки зрения, позитивным результатом консенсуса «Сепсис-3» является перевод синдрома системного воспалительного ответа (СВО) из основных критериев верификации сепсиса в дополнительные (факультативные). Слабой стороной считаем недооценку механизмов системного воспаления как общепатологического процесса в патогенезе критических состояний различной природы. С позиции общей патологии сепсис является сочетанием трех фундаментальных общепатологических процессов: классического (канонического) и системного воспаления (СВ), а также хронического системного воспаления низкой интенсивности (паравоспаления), рассматриваемого в качестве неблагоприятного фона для развития первых двух процессов. Все три процесса характеризуются теми или иными признаками СВО и нуждаются в дифференциации. А для этого необходимы комплексные критерии, отражающие конкретные звенья процессорного комплекса СВ. Актуальным примером неизбежности применения такого подхода может служить патогенез COVID-19 (инфекции SARS-CoV-2). Патогенетической основой СВ является системный микрососудистый васкулит, а основными клиническими про-

## Адрес для переписки:

Зотова Наталья Владимировна  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106,  
ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии Уральского  
отделения РАН.  
Тел.: 8 (343) 374-00-70.  
E-mail: zotovanat@mail.ru

## Contacts:

Natalia V. Zotova  
620049, Russian Federation, Yekaterinburg, Pervomayskaya str., 106,  
Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of RAS.  
Phone: +7 (343) 374-00-70.  
E-mail: zotovanat@mail.ru

## Для цитирования:

Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Черешнев В.А. «Сепсис-3»: новая редакция — старые проблемы. Анализ с позиции общей патологии // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 649–662. doi: 10.15789/2220-7619-SAN-1629

## Citation:

Gusev E.Yu., Zotova N.V., Chereshnev V.A. Sepsis-3: new edition — old problems. analysis from the perspective of general pathology // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 649–662. doi: 10.15789/2220-7619-SAN-1629

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР № АААА-А18-118020590108-7).

This work was carried out within the framework of the state assignment of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (registration number NIOKTR No. АААА-А18-118020590108-7).

явлениями — системные микроциркуляторные расстройства в виде шокогенных состояний. По-видимому, одним из направлений дальнейшего развития медицины критических состояний будет разработка более сложных, но эффективных методов оценки патогенеза критических состояний и более дифференцированных методов патогенетической терапии. В свою очередь, это потребует модернизации ряда фундаментальных положений в системе знаний патобиологии, патофизиологии и общей патологии.

**Ключевые слова:** сепсис, системная воспалительная реакция, системное воспаление, септический шок, микроциркуляция, паравоспаление, общепатологические процессы, хроническое воспаление низкой интенсивности.

## SEPSIS-3: NEW EDITION — OLD PROBLEMS. ANALYSIS FROM THE PERSPECTIVE OF GENERAL PATHOLOGY

Gusev E.Yu.<sup>a</sup>, Zotova N.V.<sup>a,b</sup>, Chereshnev V.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** Sepsis-3 Guidelines defines sepsis as an organ dysfunction caused by dysregulated host response to infection. To record organ dysfunction, the SOFA/quick SOFA scales were recommended. In fact, in medical practice, sepsis is considered nothing more than a critical infection that requires intensive care. Therefore, sepsis is pathogenetically a non-homogeneous condition manifested by diverse nosologies and syndromes. Unlike the previous two editions, Sepsis-1 and Sepsis-2 Guidelines, the formal criteria provided in the Sepsis-3 are closer to the de facto position, describe more specific, but less sensitive features to predict mortality. However, the initial, latent manifestations of critical conditions, which can be relatively effectively controlled by intensive therapy, remain outside the Sepsis-3 criteria. Not all signs of multiple organ dysfunctions (according to the Sepsis-3 criteria) will require intensive care. Hence, obviously the presence or absence of formal criteria of Sepsis-3 will not be always taken into account while verifying sepsis. The only relatively pathogenetically homogeneous definition in Sepsis-3 is “septic shock”. However, it also does not fully consider the staging (according to the degree of compensation of hemodynamic disturbances) and the phasing (according to the severity of the pro-inflammatory response) of the dynamics of the shock condition. From our point of view, a positive result of the Sepsis-3 consensus would be in transition of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) from the main to additional (optional) verifying sepsis criteria. We also believe that the weak side of the Sepsis-3 Guidelines is in underestimated mechanisms of systemic inflammation as a general pathological process in the genesis of developing critical conditions of various origins. From the perspective of general pathology, sepsis is a combination of the three common fundamental pathological processes: classical (canonical) and systemic inflammation (SI), as well as chronic systemic low-grade inflammation (parainflammation), the latter can be considered as an unfavorable background for development of the former two processes. All three processes are characterized by any SIR signs and require to be differentiated on the basis of integral criteria, which reflect specific blocks of the SI complex process. The pathogenesis of the SARS-CoV-2 infection (COVID-19) is a relevant example underlying inevitability of such approach. The systemic microvascular vasculitis, and its main clinical manifestations such as systemic microcirculatory disorders in the form of shockogenic conditions is the SI pathogenetic basis. Apparently, one of the modalities for further evolution of critical care medicine will be coupled to development of a more multilayered but effective methods for assessing pathogenesis of critical states and more differentiated methods of pathogenetic therapy. Therefore, it will require to modernize a number of fundamental premises in our knowledge about pathobiology, pathophysiology, and general pathology.

**Key words:** sepsis, systemic inflammatory reaction, systemic inflammation, septic shock, microcirculation, parainflammation, common pathological process, chronic low-grade inflammation.

### Краткая характеристика документа «Сепсис-3» и его предыдущих редакций

В феврале 2016 года журнал Американской медицинской ассоциации (JAMA) опубликовал «Третий международный консенсус по определению сепсиса и септического шока (Сепсис-3)», где были изложены новые определения и критерии сепсиса [47], отличные от представленных в предыдущих редакциях — «Сепсис-1» (1991 г.) [9] и «Сепсис-2» (2001 г.) [27]. Документ был подготовлен рабочей группой, состоящей

из 19 экспертов в области интенсивной терапии, инфекционных заболеваний, хирургии и пульмонологии, назначенных Европейским обществом медицины интенсивной терапии (ESICM) и Обществом медицины критических состояний (SCCM). Кроме того, представленный документ был одобрен 32 другими медицинскими научными обществами [47]. Сепсис стал определяться как «опасная для жизни дисфункция органов, вызванная нарушением регуляции (дисрегуляцией) ответа хозяина на инфекцию». Метод, использованный для

подготовки консенсусных предложений, представлял собой ретроспективный анализ крупных больничных баз данных двух стран — США и Германии, со значительным преобладанием первой, — с целью установить клинические и лабораторные параметры, которые наилучшим образом коррелируют с летальностью среди пациентов с подозрением на инфекцию [10]. Поскольку определение сепсиса стало основываться на «органной дисфункции/недостаточности», в основу диагностики сепсиса была положена универсальная шкала SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), регистрирующая степень этих изменений, например, пациент с SOFA  $\geq 2$  баллов соответствует критериям сепсиса при наличии очага инфекции. При этом базовый показатель SOFA должен быть нулевым, если только не было известно, что у пациента еще до начала инфекции существовала дисфункция органов. Также в «Сепсис-3» были уточнены критерии септического шока: артериальная гипотензия, требующая применения вазопрессоров для поддержания среднего артериального давления  $\geq 65$  мм рт. ст., и гиперлактатемия  $> 18$  мг/дл ( $> 2$  ммоль/л) при использовании адекватной инфузионной терапии. При этом дисфункция/недостаточность нескольких органов определяется как синдром полиорганной недостаточности (ПОН).

В свою очередь, «Сепсис-1» ранее трактовал сепсис как «системную воспалительную реакцию/ответ (СВР/SIR) на инфекцию». При этом СВР верифицировалась с помощью четырех критериев синдрома СВР (ССВР/SIRS): 1) температура  $> 38^\circ\text{C}$  или  $< 36^\circ\text{C}$ ; 2) ЧСС  $> 90$ /мин; 3) частота дыхания  $> 20$ /мин или парциальное давление  $\text{CO}_2 \leq 32$  мм рт. ст.; 4) лейкоциты крови  $> 12$  или  $< 4$  тыс./мкл или  $> 10\%$  незрелых форм. Для верификации сепсиса достаточно было двух критериев ССВР из четырех при наличии очага инфекции. Тяжелый сепсис определялся как «сепсис при наличии признаков органной или полиорганной дисфункции (по шкале SOFA)», а септический шок — как «сепсис с признаками тканевой и органной гипоперфузии с артериальной гипотонией, не устраняющейся с помощью инфузионной терапии и требующей назначения катехоламинов». В том случае, если вазопрессорная терапия не приводит к нормализации артериального давления, септический шок обозначается как рефрактерный. Низкая специфичность критериев ССВР к критичности состояния пациентов была относительно быстро обозначена как ключевая проблема «Сепсис-1» [54]. Между тем основным практическим смыслом верификации сепсиса является назначение интенсивной терапии и более затратных схем этиологической (антимикробной) терапии. Это предопределило принятие доку-

мента «Сепсис-2» для повышения специфичности верифицирующих сепсис критериев.

В «Сепсис-2» был введен ряд дополнительных (факультативных) критериев, включая два показателя СВР, а именно С-реактивный белок и прокальцитонин (PCT)  $> 2$  нормальных стандартных отклонений (SD) от нормального их значения в плазме крови [33]. При этом PCT, а позже пресепсин (sCD14) и sTREM-1, первоначально трактовались как показатели СВР, специфичные к инфекции. Однако проведенный метаанализ показывает, что PCT, sTREM-1 и пресепсин в плазме крови имеют умеренную диагностическую ценность для дифференциации сепсиса от ССВР при неинфекционном воспалении [34]. В настоящее время можно говорить только об относительной специфичности этих и других критериев СВР к инфекционному, как правило, бактериальному, процессу, например при дифференцировке вирусных (неосложненных шоком) от бактериальных инфекций, а также для обоснования отмены антибиотикотерапии и в некоторых других случаях. В целом редакция «Сепсис-2» существенным образом не решила вышеозначенные проблемы «Сепсис-1». Кроме того, в клинических базах данных Евросоюза, Северной Америки, Австралии и Новой Зеландии стали накапливаться данные, говорящие не только о низкой специфичности критериев ССВР к критическим состояниям, но также и об отсутствии абсолютной чувствительности критериев ССВР к сепсису при его верификации [47]. Так, по данным многоцентрового анализа, в развитых странах примерно в  $1/8$  числа случаев диагноз «сепсис» верифицировался при отсутствии критериев ССВР [47].

Одновременно решались и другие проблемы сепсиса. В частности, отсутствие четких критериев отнесения пациентов к группе септических и четкой характеристики патогенеза сепсиса, побудили к внедрению более расширенной концепции учета основных принципов характеристики и ведения пациентов, известной как PIRO [41]: *Predisposition* (предрасположенность) — возраст, генетические факторы (прежде всего, первичные иммунодефициты), сопутствующие заболевания, иммуносупрессивная терапия, другие средовые причины ослабления иммунитета, включая негативные факторы образа жизни, условий проживания и работы; *Infection* (инфекция) — локализация очага инфекции, патогенные свойства возбудителей инфекции; *Response* (реакция/ответ) — критерии ССВР, концентрация прокальцитонина, С-реактивного белка и другие критерии СВР; *Organ dysfunction* (органная дисфункция) — оценка по шкале SOFA. Следует отметить, что принципы концепции PIRO носят универсальный характер и широко применяются в медицине при многих патологиях.

Таким образом, наиболее существенными изменениями редакции «Сепсис-3» являются отмена критериев ССВР и упразднение дефиниции «тяжелый сепсис», поскольку критерии сепсиса стали соответствовать критериям тяжелого сепсиса 1-й и 2-й редакции. Верификация септического шока в «Сепсис-3» была усилена критерием гиперлактатемии. Кроме того, для предварительной верификации сепсиса в любых условиях был предложен упрощенный вариант шкалы SOFA — quick SOFA (qSOFA), не требующий стационарной аппаратуры [31]. При этом для верификации сепсиса достаточно двух из трех критериев шкалы qSOFA: 1) частота дыхания  $\geq 22$ /мин; 2) систолическое артериальное давление  $\leq 100$  мм рт. ст.; 3) изменение сознания — шкала комы Глазго  $\leq 14$  баллов [47].

Поскольку основной вариант SOFA и ранее использовался для формализации дефиниции «тяжелый сепсис», возникает вопрос: в чем была основная причина принятия 3-й редакции? На наш взгляд, это обнуление накопившихся противоречий между наличием формальных критериев и фактической верификацией сепсиса, фиксируемых в медицинских базах данных развитых стран. Мы также отмечали эти противоречия [6], но при этом обосновывали и теоретическую неэффективность концепции ССВР применительно к проблеме патобиологии сепсиса и критических состояний неинфекционной природы. Одновременно мы отмечали и положительное значение концепции ССВР, а именно определение связи критических состояний с провоспалительными механизмами на системном уровне, включая такие понятия как «цитокиновый шторм», «системная воспалительная реакция», «системное воспаление», «системная воспалительная микроциркуляция». К сожалению, этот идеологический конструкт в редакции «Сепсис-3» был в значительной степени утрачен и заменен на патогенетически неконкретное понятие — «дисрегуляция ответа хозяина».

В частности, непонятно, можно ли всегда трактовать реакцию организма как регулирующую в условиях прогрессирования инфекционного процесса еще до момента верификации сепсиса. Как известно при многих критических состояниях и даже тяжелых хронических заболеваниях асептической природы отмечается феномен нарушения барьерной функции кишечника для микробных антигенов, включая поступление в кровотоки эндотоксина — липополисахарида грамотрицательных бактерий (LPS) [19, 40]. Более того, введение животным LPS является общепринятой моделью септического шока [57]. В этих случаях можно говорить о реакции организма, в том числе и дисфункциональной, на микробные факторы, но без

инфекции. При критических состояниях отмечается комбинация факторов системного повреждения инфекционной и неинфекционной природы, на которые ответ организма не является полностью ни адаптивным, ни, напротив, неадаптивным [47]. Поэтому некоторые авторы в принципе ставят под сомнение определение сепсиса как дисрегуляции реакции хозяина [7]. Кроме того, определение «дисрегулируемый, или дисфункциональный, ответ на инфекцию» подразумевает отсутствие типового подхода и то, что в дальнейшем нужно будет вводить в научный оборот формулировки «дисрегуляция ответа на травму, отравления, кровопотерю, гипоксию, на аллергены при анафилактическом шоке и т. д.».

Наша позиция по обозначенным выше противоречиям заключается в следующем. Инфекция — это инфекционный процесс, который включает целенаправленное действие на организм инфектов и ответ организма на это воздействие. В свою очередь, ответ организма включает две основные и взаимосвязанные генетически детерминированные составляющие. Во-первых, это регуляция — действие, направленное на приведение измененных параметров системы к нормальным параметрам (гомеостазу). Во-вторых, это формирование функциональных систем, которые управляемо и целенаправленно, но временно изменяют определенные параметры клеточного, тканевого и организменного гомеостаза для достижения полезного (адаптивного) для организма результата в условиях действия повреждающих факторов. После чего эти функциональные системы распадаются, а гомеостаз восстанавливается механизмами саморегуляции этих процессов. Дезадаптация к инфекционному воздействию может быть связана как с дефектами механизмов регуляции, так и с неспособностью функциональных систем воспаления и иммунного ответа купировать действие повреждающих факторов. Таким образом, при сепсисе правильнее говорить о дисфункциональном ответе организма в целом, а не только о его дисрегуляции. Кроме того, надо конкретизировать понятие «дисфункция» при характеристике сепсиса, поскольку «дисфункция ответа организма» — это одно из ключевых проявлений любого заболевания. С учетом вышесказанного мы рассматриваем с позиции общей патологии третью дефиницию сепсиса как, прежде всего, клиническую, но недостаточно конкретную и теоретически (патогенетически) не вполне систематизированную.

Избежит ли верификация сепсиса, основанная на документе «Сепсис-3», противоречий в медицинской статистике между наличием формальных критериев и установлением диа-

гноза де-факто, присутствовавших в документах «Сепсис-1»/2? Мы даем на этот вопрос однозначный ответ — нет, не избежит. Приведем пример из собственной научной практики [59, 60]: пациенты ( $n = 40$ , военнослужащие 18–30 лет) с флегмонами нижних конечностей 3 степени (поражение кожи, подкожной клетчатки и мышц), средний балл SOFA (в первые сутки госпитализации) — 3,6; ПОН (у большинства по трем органам системам), лечение в хирургическом отделении, интенсивная терапия не применялась, летальных исходов нет. При этом, по данным экспертов «Сепсис-3», при  $\text{SOFA} \geq 2$  баллов риск летальных исходов пациентов составляет приблизительно 10% от общей больничной популяции с предполагаемой инфекцией [47]. Очевидно, что далеко не все случаи с наличием формальных критериев «Сепсис-3» будут верифицированы как сепсис, поскольку эта верификация влечет задействование более длительных и затратных клинических протоколов. Между тем у 4 пациентов этой группы определялись латентные признаки системного микротромбообразования (D-димеры  $> 500$  нг/мл), а у двух — явные признаки повреждения миокарда (тропонин I  $> 10$  нг/мл). Таким образом, как минимум эти двое пациентов все же нуждались в патогенетической терапии в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Другой очевидной, но противоположной по направленности проблемой, является ложноотрицательный результат критериев «Сепсис-3» при определении пациентов, нуждающихся в интенсивной терапии [20]. Так, в отличие от критериев «Сепсис-3», критерии первых двух редакций с большей вероятностью выделяют критических пациентов до того, как у них разовьется недостаточность органов, что приведет к более быстрому началу спасительных вмешательств [14]. Очевидно, что патогенетические механизмы, приводящие к критическому состоянию, могут предшествовать появлению признаков органной/полиорганной дисфункции [47]. В проспективных когортных многоцентровых исследованиях было показано, что при прогнозировании внутрибольничной смертности, согласно «Сепсис-1/2» (критерии ССВР), перекоп был в пользу чувствительности в ущерб специфичности, а в «Сепсис-3», наоборот, отмечается высокая специфичность и низкая чувствительность критериев (qSOFA) [20]. В определенной степени проблема прогноза критических осложнений может решаться посредством использования дополнительных интегральных критериев, занимающих промежуточное положение между параметрами ССВР и qSOFA по соотношению «чувствительность/специфичность» к ранней верификации сепсиса за пределами ОРИТ, например шкал раннего

предупреждения: EWS (Early Warning Score) [36], MEWS (Modified Early Warning Score), NEWS (National Early Warning Score) [13].

Возникают вопросы и относительно эффективности общепринятой шкалы SOFA, которая используется как стандартный метод оценки органной дисфункции и ПОН. В частности, такой параметр SOFA, как снижение количества тромбоцитов, в большей мере отражает наличие феномена диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС), а не органной дисфункции; шкала комы Глазго (входит в SOFA) отличается субъективностью оценки общей церебральной недостаточности, особенно на начальных этапах ее развития; также шкала SOFA не способна эффективно оценивать степень снижения функциональных резервов органной системы, а это часто дополнительно требует использования шкал оценки общего состояния пациента, включая APACHE II/III и SAPS II [18]. Также в рамках концепции «Сепсис-3» не дифференцируются такие понятия, как «органная дисфункция» и «органная недостаточность». Кроме того, установление произвольных пределов изменений для SOFA и qSOFA может потенциально ввести в заблуждение, давая ложное, упрощенное представление об однородности патогенеза сепсиса [14].

Остаются проблемы и при верификации сепсиса вирусной природы, особенно у детей [25, 28]. В настоящее время нет единого консенсусного определения неонатального сепсиса [35]. В целом для обоснования лечения пациента в ОРИТ при инфекции используется более широкий спектр информации, чем формальные критерии «Сепсис-3» [22, 26]. В конечном итоге авторы консенсусного решения «Сепсис-3» вынуждены признать [47]: «Прежде всего, сепсис — это широкий термин, применяемый к не полностью понятному процессу. Пока еще нет простых и однозначных клинических критериев или биологических, визуализирующих или лабораторных признаков, которые бы однозначно идентифицировали септического пациента».

## Особенности концепции документа «Сепсис-3» в России

В России ведущие специалисты по сепсису сформулировали свою коллективную позицию в виде практического руководства для врачей [5]. В основном предложенные ими формулировки совпадают с формулировками общепринятой редакции «Сепсис-3», но имеют некоторые дополнения. Так, авторы издания дали следующее определение: «Сепсис — это патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного (системного) воспаления на инфекцию

различной природы (бактериальную, вирусную, грибковую) в сочетании с остро возникшими признаками органной дисфункции и/или доказательствами микробной диссеминации». Далее авторы пояснили, что они понимают системным воспалением — это наличие критериев ССВР, что, по нашему мнению, является шагом назад. Во-первых, критерии ССВР и в рамках концепции «Сепсис-3» могут, в принципе, использоваться для определения степени риска критических осложнений, но наряду с другими такими же дополнительными, но более эффективными методами мониторинга состояния пациентов. Во-вторых, идеологическая роль концепции ССВР в понимании патофизиологии сепсиса к настоящему времени, как мы полагаем, исчерпана с учетом современных теоретических и клинико-лабораторных возможностей оценки патогенеза критических состояний. В конечном итоге это, наряду с низкой чувствительностью критериев ССВР к критическим состояниям, и привело к дискриминации идеологии ССВР в «Сепсис-3». Далее российские эксперты дают следующее уточнение: «Сепсис — синдром СВР (SIRS) инфекционной природы в сочетании с остро возникшими признаками повреждения собственных тканей и органов». В свою очередь клинико-лабораторные признаки сепсиса были определены как «наличие очага инфекции, синдрома СВР в сочетании с признаками органно-системной дисфункции в 2 и более баллов согласно шкале SOFA или без таковых, при наличии отдаленных пиемических очагов». По-видимому, авторы не дифференцируют понятие «органно-тканевое повреждение» от «органная дисфункция». Кроме того, непонятно, как септикопиемия (наличие вторичных очагов инфекции) характеризует патогенез сепсиса в отсутствие органной дисфункции, тем более если это касается внутренних органов, где пиемические очаги в ряде случаев могут выявляться только при патологоанатомическом исследовании [55]. Конечно, не вызывает сомнения, что в большинстве случаев пациенты с септикопиемией нуждаются в интенсивной терапии в условиях ОРИТ. По-видимому, это позволяет некоторым экспертам рассматривать септикопиемию в качестве особого подтипа сепсиса. Также в рассматриваемом издании, но уже в полном соответствии с концепцией «Сепсис-3», вводятся такие понятия как «септический шок», «рефрактерный септический шок», «синдром ПОН». В целом участники российского консенсуса пытались преодолеть очевидные ограничения концепции «Сепсис-3» (отсутствие целостного образа патогенеза), но эта цель, как нам представляется, в полной мере не была достигнута.

## Сепсис с позиции общей патологии

В клинической практике, как мы полагаем, сепсис де-факто — это остроразвивающееся (с возможной пролонгацией до подострого и даже рецидивирующего хронического течения) критическое состояние, связанное с бактериальной, грибковой или вирусной инфекцией, требующее использования протоколов интенсивной терапии (патогенетической и этиологической — антимикробной) и/или наблюдения за состоянием пациента в условиях ОРИТ для последующего уточнения диагноза. С этих позиций сепсис — это, прежде всего, клиническое понятие (нечеткая дефиниция), интегрирующее значительное число нозологий (в зависимости от локализации и характеристики возбудителя, очага инфекции) и синдромов (преимущественно реанимационных). Таким образом, в редакции «Сепсис-3» его формальные характеристики приблизили к де-факто, отказавшись от сомнительного понятия «сепсис-синдром», поскольку в большинстве случаев сепсис скорее является мультисиндромом, нестабильным по составу реанимационных синдромов. При этом к основным реанимационным синдромам можно отнести синдром ПОН, ДВС-синдром, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и некоторые другие [3].

Определить сепсис с позиции общей патологии значит характеризовать его посредством теории общепатологических (типовых патологических) процессов. Модели общепатологических процессов являются интегральными, нечеткими законами патологии. Они отражают наиболее общие закономерности патофизиологии различных по своей природе заболеваний. При этом все разнообразие патологий можно обобщить до нескольких типов основных общепатологических процессов. В свою очередь, наиболее общей их закономерностью является развитие тех или иных стадий тканевого стресса с образованием провоспалительного фенотипа у различных типов клеток, но особенно у иммунцитов [19].

К развитию острой и хронической органной дисфункции/недостаточности могут привести (а также отразить ее), многие общепатологические процессы, точнее их различные комбинации. Среди них можно выделить ключевой для понимания патогенеза шокогенных состояний процесс, имеющий отношение не только к сепсису, но и к развитию критических состояний неинфекционной природы. Таким общепатологическим процессом, по нашему мнению, является системное воспаление (СВ). При этом необходимо дифференцировать СВ от понятия системной воспалительной реакции (накопление в крови медиаторов воспаления, острофаз-

ных белков, лейкоцитов, других флоготических факторов), которая является одним из феноменов не только СВ, но и классического воспаления. Так, СВР и другие системные изменения при классическом воспалении могут иметь как адаптационное, так и при их дисфункции дезадаптационное значение. Однако в целом они протективны и направлены на ресурсное обеспечение защитных механизмов очага воспаления. Кроме того, СВ необходимо отличать и от СВР при системных проявлениях «хронического воспаления низкой интенсивности» (chronic low-grade inflammation) [19]. При этом признаки СВР могут кратковременно проявлять себя в экстремальных состояниях даже у клинически здоровых людей [43]. С нашей точки зрения, эти патологические и экстремально физиологические феномены относятся к категории паравоспаления, а именно к развитию тканевого стресса на подпороговые для возникновения СВ и очага классического воспаления действия повреждающих факторов и изменений гомеостаза [19]. Характерными примерами патологий, связанных с системным паравоспалением, являются метаболический синдром, диабет 2 типа, эссенциальная гипертензия, атеросклероз, нейродегенерации пожилого возраста. Системные и локальные проявления паравоспаления относятся к факторам риска развития СВ и других осложнений классического воспаления. При этом нельзя отрицать возможность развития органных дисфункций в качестве этих осложнений при сепсисе и без СВ [59].

Таким образом, возникает необходимость дифференциации СВ от иных вариантов воспалительного процесса, включающих признаки СВР, а в некоторых случаях и проявления органных дисфункций. В 2001 г. («Иммунология Урала», № 1, С. 4–8) мы дали следующее определение: «Системное воспаление — это типовой, мультисиндромный, фазоспецифичный патологический процесс, развивающийся при системном повреждении и характеризующийся общей воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, факторов плазмы и клеток крови, соединительной ткани, микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах». Так, при СВ интенсивность системной альтерации должна быть сопоставима с локальным повреждением в очаге классического воспаления, чтобы реализовался феномен системной воспалительной микроциркуляции (системного микрососудистого васкулита). Таким образом, феномен воспалительной микроциркуляции является атрибутом очага классического воспаления [50], а на системном уровне — шокогенным проявлением СВ [3]. Проблема заключается в том, что однозначно идентифицировать СВ с помощью измерения уровня СВР можно

только в ограниченном числе случаев, например при тысячекратных повышениях в крови некоторых цитокинов («цитокиновый шторм» — признак гиперергической фазы СВ). Эта проблема связана не только с недостатками диагностики, но и со сложностью, противоречивостью патогенеза и динамики критических состояний [3, 4]. Во-первых, не все критические состояния связаны только с СВ. Во-вторых, процесс системной альтерации может развиваться постепенно, что приводит к образованию «серой зоны», или зоны неопределенности, когда нельзя утверждать ни наличие, ни отсутствие СВ. В-третьих, развитие СВ характеризуется несколькими фазами, включая обратимые этапы СВ при относительно постепенном развитии этого процесса (когда наличие органных дисфункций может и не фиксироваться). В-четвертых, критические фазы СВ могут быть гипозергическими (депрессивными), когда возникает диссонанс между критичностью состояния пациента и относительно слабой выраженностью СВР. Между тем СВ характеризуется не только широким диапазоном уровней СВР, но и наличием других феноменов, позволяющих верифицировать фазы этого процесса [3, 4, 59, 60]. К таким феноменам (функциональным блокам) СВ можно отнести определенную выраженность вторичного системного тканевого повреждения, дистресс-реакцию нейроэндокринной системы, признаки системных расстройств микроциркуляции, включая феномен микротромбообразования (клинически может проявляться в виде ДВС-синдрома), некоторые другие признаки СВ.

В настоящее время имеется значительное число критериев различных функциональных блоков СВ, включая как уже апробированные в медицине показатели СВР [24, 42, 60], так и новые перспективные критерии, а именно маркеры повреждения эндотелиального гликокаликса [17, 56], показатели системной активации эндотелиоцитов [60], определение в крови внеклеточных везикул, характеризующих системный клеточный стресс [45], а также методы прижизненного исследования нарушений тканевой перфузии и кислородного транспорта на уровне микроциркуляции крови [8, 21, 29]. Помимо этого, для оценки СВ целесообразно использовать общепринятые критерии реанимационных синдромов и апробированные в клинике различные критерии органных повреждений и дисфункций. При этом необходимо выделить ряд клинических состояний, при которых можно говорить о наличии СВ априори, — это септический шок, ОРДС, прямо не связанный с первичным повреждением легких, ДВС-синдром, особенно на стадии коагулопатии потребления. Также в пользу СВ будет свидетельствовать быстрое нарастание признаков ПОН, несмотря на использование интенсивной терапии.

Остановимся на актуальном в настоящее время примере, а именно COVID-19 — коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 [37, 58]. Это заболевание характеризуется возможностью критических осложнений вирусной пневмонии по варианту ОРДС, гиперактивацией иммунокомпетентных клеток, включая развитие вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (гемофагоцитарного синдрома), гипервоспалительного синдрома с возможной молниеносной и фатальной гиперцитокинемией — синдрома цитокинового шторма (CSS, cytokine storm syndrome) или синдрома высвобождения цитокинов (CRS, cytokine release syndrome). Факторами риска этих осложнений являются пожилой возраст, хронические воспалительные заболевания органов дыхания и системные паравоспалительные заболевания, включая системный эндотелиоз, патологическое ожирение, патологии сердечно-сосудистой системы, различные причины снижения функциональных резервов легких и других жизненно важных органов. На этом фоне к развитию критического осложнения COVID-19, ОРДС, может привести сочетание местных дисфункциональных процессов гипервоспаления классического типа и индукция СВ, особенно при наличии прогрессирующей ПОН и септического шока. Поскольку в основе процессов паравоспаления, классического воспаления и СВ лежит, в принципе, большое число общих провоспалительных механизмов, включая развитие СВР, необходимо отслеживать трансформацию общепатологических процессов у каждого конкретного критического пациента. В конечном итоге большинство летальных исходов в ОРИТ связано с СВ [59]. Однако наиболее очевидным клиническим проявлением СВ при инфекции является септический шок.

## Оценка септического шока и классификация шоковых состояний с позиции теории типовых патологических процессов

Септический шок является самостоятельной клинической дефиницией [11]. При этом он определяется как клиническая форма сепсиса, при которой особенно глубокие нарушения кровообращения, клеточные и метаболические изменения связаны с более высоким риском летальности по сравнению с сепсисом [47]. Однако септический шок нельзя рассматривать в отрыве от типовых характеристик патогенеза шоковых состояний иной природы. В настоящее время в мировой научной литературе принято разделять шоковые состояния на 4 класса [49]:

1. *Гиповолемический шок* — это неотложное состояние недостаточной перфузии органов, вызванное потерей внутрисосудистого объема.

Он делится на три основных подтипа: А) геморрагический шок, возникающий в результате острого кровоизлияния без серьезного повреждения или Б) с повреждением мягких тканей; В) травматический шок без острой кровопотери, но с высвобождением медиаторов иммунной системы.

2. *Распределительный, или дистрибутивный, шок* представляет собой состояние относительной гиповолемии, возникающей в результате патологического перераспределения внутрисосудистого объема крови, и является наиболее частой формой шока. Включает три подтипа: А) септический; Б) анафилактический/анафилактоидный; В) нейрогенный шок (дисбаланс симпатической и парасимпатической нервной регуляции). Ядром патофизиологии дистрибутивного шока, точнее вариантов А и Б, является эндотелиальная дисфункция, которая приводит к снижению тонуса и увеличению проницаемости сосудов (синдром капиллярной утечки), в результате чего происходит нарушение распределения крови во внутрисосудистой среде, блокада макро- и микроциркуляции крови.

3. *Кардиогенный шок* (острая недостаточность сократительной функции миокарда).

4. *Обструктивный шок* (обтурация магистральных артерий или сердца).

При этом септический шок, по мнению многих авторов, является смешанной формой различных проявлений шоковых процессов — гиповолемии, вазодилатации, нарушения функции сердца и других органов, системной коагулопатии [11, 49]. Все эти признаки вписываются в процессоконкомплекс СВ.

Рассмотрим патогенез этих связанных с СВ нарушений в виде предельно общей схемы. Так, среди многочисленных факторов, способных инициировать феномен воспалительной микроциркуляции можно выделить следующие. Во-первых, это генерализация молекулярных структур, действующих через паттерн-распознающие рецепторы (ПРР) на эндотелиоциты, тромбоциты, сосудистые макрофаги и внутрисосудистые лейкоциты. Основными лигандами ПРР являются консервативные структуры микроорганизмов — PAMP (pathogen-associated molecular pattern, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны), а также эндогенные молекулы — DAMP (damage-associated molecular pattern, связанные с повреждением молекулярные паттерны). Получая сигнал через ПРР от PAMP и DAMP, клетки могут быстро входить в состояние провоспалительного стресса [19]. Во-вторых, это системная гипоксия, которая запускает клеточный стресс, действуя на различные клетки прямо, через определенные транскрипционные факторы клеточного стресса. В-третьих, это поступление в кровоток, в том числе вследствие критической для органов ги-

поксии, продуктов клеточного распада, содержащих не только DAMP, но и другие активаторы систем гемостаза и комплемента, калликреин-кининовой системы [19]. При этом нарушения кислородного транспорта и развитие системной гипоксии являются атрибутными признаками любого шока [49], которые путем обозначенных выше и других механизмов гипоксии могут привести к СВ. Таким образом, на определенной стадии своего развития любой вид шока может трансформироваться в СВ-шок. Также дополнительное активационное влияние на клетки микрососудов уже в процессе развития СВ могут оказывать высокие дозы некоторых провоспалительных цитокинов, прежде всего TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  [3]. Наконец, трансформация физиологической микроциркуляции в воспалительную характеризуется деструкцией гликокаликса эндотелиоцитов [17], повышенной экспрессией на их поверхности индуцибельных рецепторов

(стрессорный фенотип), образованием зазоров между эндотелиоцитами посткапилляров [44], образованием в посткапиллярах микротромбов и адгезией клеток крови на эндотелии, а на конечных стадиях — опасными для жизни микроциркуляторными расстройствами [3].

С нашей точки зрения, современная классификация шоковых состояний не в полной мере учитывает механизмы СВ, их динамику и адаптационные возможности. В значительной степени это касается и септического шока в редакции «Сепсис-3» [11, 47]. Поэтому мы предлагаем альтернативную схему классификации и динамики шоковых состояний с учетом оценки СВ как общепатологического процесса (рис.).

1) Стадия частичной компенсации (субкомпенсации) за счет механизмов централизации кровообращения. Эти механизмы реализуются не только на обратимых этапах развития СВ-шока, но и при многих видах шока еще до раз-



**Рисунок. Классификация и динамика развития шоковых состояний с позиции системного воспаления как общепатологического процесса**

Figure. Classification and dynamics of shock states from the position of systemic inflammation as a general pathological process

**Примечание.** ПредСВ-шок — это шок различного генеза, не связанный на начальном этапе своего развития с феноменом системной воспалительной микроциркуляции. Жирными стрелками обозначены наиболее вероятные направления развития шока, альтернативные выздоровлению, при использовании интенсивной терапии. Короткими поперечными линиями обозначены пять возможных мест блокировки направлений развития шока, обусловленных применением интенсивной терапии.

Note. Pre-shock is a shock of different genesis, not associated with the phenomenon of systemic inflammatory microcirculation at the initial stage of its development. Bold arrows indicate the most probable directions of shock development, alternative to recovery, when intensive care is used. Short transverse lines indicate five possible places of blocking the directions of shock development by the use of intensive therapy.

вития СВ — последнее можно обозначить как предСВ-шок (шоковые состояния без характерных признаков СВ). Подстадия предСВ-шока не характерна для инфекционного процесса, поскольку он, как правило, развивается относительно постепенно, а септический шок возникает на фоне и вследствие СВ. Подстадия предСВ-шока в наиболее благоприятном варианте может купироваться противошоковой терапией и не переходить в СВ-шок. Это определяет необходимость своевременного применения противошоковой терапии, в частности при массивной кровопотере [48].

2) Рефрактерная стадия СВ-шока характеризуется декомпенсацией механизмов поддержания макрогемодинамики, критической децентрализацией кровообращения, выраженным феноменом протечки капилляров, низкой вероятностью благоприятного исхода. По нашим данным, эта стадия развивается не раньше, чем через 3–8 ч после начала массивной акушерской кровопотери, острой травмы, эмболии околоплодными водами (исходно анафилактикоидный шок) [4, 59]. На этой стадии СВ-шока патогенез шокового процесса мало зависит от исходной причины критического состояния, но в значительной степени — от фазности СВ (рис.). При этом депрессивная фаза септического шока, по нашим данным, доминирует при затяжном/подостром сепсисе [59, 60]. Несмотря на относительно умеренные проявления СВР, она характеризуется стабильностью критического состояния и высокой летальностью (> 90%).

С одной стороны, обозначенные выше закономерности (наличие типовых проявлений СВ-шока) определяют использование общих принципов противошоковой терапии [39]. Однако с другой, они дают объяснение неоднозначности результатов использования противовоспалительной терапии септического шока [51], когда гетерогенность и фазность патогенеза СВ-шока не учитываются.

## Влияние инфекционного фактора на типовые закономерности патогенеза сепсиса

Инфекция является ключевым фактором, определяющим эволюцию иммунной системы. Качественным скачком этой эволюции стало появление всех основных атрибутов классического воспаления и адаптивного иммунитета лимфоцитарного типа у позвоночных [1]. По мере развития системы кровообращения и других органных систем особую опасность стали представлять вирусные и внеклеточные бактериальные инфекции, способные к быстрой генерализации в организме по сосудистой сети.

Эволюционным ответом на эти вызовы стали экссудативно-сосудистые реакции немедленного типа и развитие экссудативно-деструктивного воспаления у высших позвоночных, а именно творожистого воспаления у рептилий и птиц, а у млекопитающих — более совершенного гнойного воспаления [1]. При этом млекопитающие способны не только развивать более прогрессивные варианты классического воспаления, но и отвечать выраженной реакцией микрососудов на повреждения как в очаге воспаления, так и на системном уровне. Вследствие этого при инфекции основной причиной смерти других высших позвоночных — птиц и рептилий — в отличие от млекопитающих является колонизация микробами жизненно важных органов, включая ствол мозга и/или миокард, т. е. непосредственное поражение внутренних органов возбудителями инфекции [1].

У человека септикопиемия не является атрибутом сепсиса, роль вторичных очагов инфекции при септикопиемии неоднозначна в сопоставлении с другими причинами летальных исходов. Это касается и бактериемии без вторичной колонизации внутренних органов при сепсисе (септицемии). Так, авторы редакции «Сепсис-3» отмечают, что дополнительной проблемой является редкое подтверждение инфекции микробиологическими методами, когда лечение только начинается и даже когда микробиологические тесты завершены, они выявляют бактериемию при верифицированном «сепсисе» только в 30–40% случаев [47].

В большинстве случаев сепсис связан с пиогенной инфекцией, а бактериемия в этих случаях является дополнительным критерием прогноза критических осложнений. Однако при дефиците барьерной функции очага воспаления более очевидными индукторами критического для жизни системного тканевого стресса являются растворимые PAMP и DAMP, активированные факторы систем гемостаза и комплемента, некоторые другие изменения гомеостаза внутрисосудистой среды. При этом зачастую отсутствует прямая связь бактериемии и генерализации PAMP, например, по содержанию в крови живых грамотрицательных бактерий и LPS [23]. Кроме того, грамотрицательные бактериемии в госпитальных условиях могут выявляться за пределами ОРИТ не менее чем в половине случаев [32]. При этом транзиторная бактериемия не является редким событием у человека и не представляет существенной опасности, как, например, бактериемия в качестве последствия различных стоматологических манипуляций [30, 53]. В свою очередь, возникновение и опасность персистирующей бактериемии является результатом дисбаланса в сложном взаимодействии между вторгаю-

шимися микроорганизмами и защитными механизмами хозяина. Дисфункция этих механизмов зависит от степени тканевого старения, наличия сопутствующих заболеваний, различных средовых воздействий и генетических факторов [12, 52]. Выявление бактериемии приобретает существенное значение в случаях верификации сепсиса, когда первичный очаг инфекционного воспаления не выявляется или слабо выражен, например при инфекционных осложнениях различных катетеризаций [46]. В этих случаях в качестве очага инфекции можно рассматривать кровь.

Таким образом, наличие в кровотоке патогенов не является атрибутивным признаком критических состояний, поскольку существуют гомеостатические механизмы очистки крови от микробного, а также эндогенного клеточного и метаболического мусора. Реализация этих механизмов в норме не должна приводить к неуправляемой активации микрососудов на системном уровне. Рассмотрим некоторые из этих механизмов несколько подробнее. Так, макрофаги микрососудов, прежде всего клетки Купфера синусоидных капилляров печени, обеспечивают очистку крови от клеточного и метаболического мусора, распознавая его с помощью рецепторов-мусорщиков (SR, scavenger receptor) [2]. Эти рецепторы включают более 30 представителей, обладающих низкой лигандной специфичностью, что позволяет им обеспечивать распознавание различных объектов фагоцитоза/пиноцитоза от PAMP и DAMP до собственных апоптотных и поврежденных клеток или модифицированных белков и гетерополисахаров. Другой особенностью SR является увеличение их экспрессии на клетках по мере возрастания концентраций их лигандов в крови, а также способность образовывать функциональные комплексы с классическими PRR, прежде всего TLR (Toll-like receptor, толл-подобные рецепторы) [2]. Последнее свойство позволяет SR регулировать развитие клеточного стресса макрофагов, эндотелиоцитов и некоторых других клеток как в направлении усиления (в очаге воспаления), так и ограничения (на системном уровне). Эти и другие механизмы позволяют оптимизировать и гармонизировать развитие тканевого стресса в очаге воспаления, лимфоидных органах и системном уровне при классическом воспалении. Однако при дисфункции этих механизмов они сами могут включаться в порочный патогенетический круг развития СВ [2].

Проникшие в кровоток микробы фагоцитируются тромбоцитами без достаточно выраженного бактерицидного эффекта [15], фиксируются на поверхности или внутри эритроцитов [38] либо образуют комплексы с различными эндогенными белками (включая антитела и ком-

племент, С-реактивный белок, фибронектин, фибриноген/фибрин и др.) и в таком виде поглощаются сосудистыми макрофагами с участием SR и других рецепторов [1, 16]. Обычно при адекватной инфекционному воздействию барьерной функции очага воспаления и дренирующих его лимфоузлов количество растворимых PAMP, проникших в кровоток, и тем более жизнеспособных микроорганизмов невелико, и активация сосудистых макрофагов носит умеренный характер. В свою очередь, возможность для таких концентраций PAMP и DAMP патологически активировать эндотелиоциты на системном уровне еще менее очевидна в силу слабой выраженности экспрессии PRR на неактивированных клетках и экранировки PRR неповрежденным гликокаликсом [17]. Поэтому развитие локального и системного тканевого стресса, включая микрососуды, при классическом воспалении качественно различается. При нарастающем воздействии факторов системной альтерации ситуация кардинально меняется: возникают условия для формирования феномена воспалительной микроциркуляции — главного атрибута СВ.

Кроме факторов иммунной системы, обеспечивающих барьерные функции очага воспаления, большое значение для возникновения инфекционных осложнений имеет исходное состояние сосудистой сети, а также наличие функциональных резервов жизненно важных органов и регуляторных систем, обеспечивающих сохранность гомеостаза. Как уже отмечалось, устойчивое изменение этих параметров на системном уровне (возникновение аллостаза) характерно для многих хронических патологий, связанных с общепатологическим феноменом воспаления низкой интенсивности (системным паравоспалением) [19].

В настоящее время известно, что различные инфекционные индукторы сепсиса, например грамположительные и грамотрицательные бактерии, могут оказывать различное влияние на вероятность развития критических осложнений сепсиса, прежде всего септического шока [5, 47]. Однако основные патофизиологические закономерности СВ носят типовой характер вне зависимости от этиологического фактора [59].

## Заключение

С позиции общей патологии сепсис как критическая для жизни инфекция является в той или иной степени сочетанием трех фундаментальных общепатологических процессов — классического (канонического) и системного воспаления, обычно в качестве критического осложнения первого, а также хронического системного

паравоспаления в виде неблагоприятного фона для развития первых двух типовых процессов. Основными эффекторами СВ являются клетки-резиденты микрососудов и параваскулярной среды, а также взаимодействующие с ними лейкоциты, тромбоциты и белки плазмы крови. Ключевыми клиническими проявлениями СВ являются системные микроциркуляторные расстройства в виде шокогенных состояний. Динамика СВ может включать обратимые стадии (чувствительные к интенсивной терапии), а также крайне критические фазы с различной

степенью выраженности СВР, что необходимо учитывать при верификации этого процесса (дифференциации от других вариантов воспаления) и его купирования.

Таким образом, характеристика неоднозначного образа патогенеза сепсиса требует решения фундаментальных проблем на уровне моделирования ключевых общепатологических процессов. Без этого условия, решение частных клинических задач сепсиса будет на каждом шагу сталкиваться с нерешенностью этих общих проблем.

## Список литературы/References

1. Гусев Е.Ю., Журавлева Ю.А., Зотова Н.В. Взаимосвязь эволюции иммунитета и воспаления у позвоночных // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139, № 1. С. 59–74. [Gusev E.Yu., Zhuravleva Yu.A., Zotova N.V. Correlation of immunity evolution and inflammation in vertebrates. *Uspekhi sovremennoi biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2019, vol. 139, no. 1, pp. 59–74. (In Russ.)] doi: 10.1134/S0042132419010058
2. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., Черешнев В.А. Физиологическая и патогенетическая роль рецепторов-мусорщиков у человека // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22, № 1. С. 7–48. [Gusev E.Y., Zotova N.V., Zhuravleva Yu.A., Chereshev V.A. Physiological and pathogenic role of scavenger receptors in humans. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 7–48. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PAP-1893
3. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 1. Общая характеристика процесса // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012. Т. 56, № 4. С. 3–14. [Gusev E.Yu., Chereshev V.A. Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part I. General characteristics of the process. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2012, vol. 56, no. 4, pp. 3–14. (In Russ.)]
4. Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., Зубова Т.Э., Руднов В.А., Кузьмин В.В., Макарова Н.П., Лейдерман И.Н., Левит Д.А., Суханов В.А., Сипачев А.С., Бражник А.Ю., Решетникова С.Ю., Засорин А.А., Дрозд А.В. Варианты развития острого системного воспаления // Цитокины и воспаление. 2008. Т. 7, № 2. С. 9–17. [Gusev E.Yu., Yurchenko L.N., Chereshev V.A., Zotova N.V., Zhuravleva J.A., Zubova T.E., Rudnov V.A., Kuzmin V.V., Makarova N.P., Leiderman E.N., Levit D.A., Sukhanov V.A., Sipachev A.S., Bragnikov A.Y., Reshetnikova S.Y., Zadorin A.A., Drozd A.V. The variants of acute systemic inflammation evolution. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2008, vol. 7, no. 2, pp. 9–17. (In Russ.)]
5. Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение / Под ред. Б.Р. Гельфанда. 4-е изд., доп. и перераб. Москва: ООО «Медицинское информационное агентство», 2017. 408 с. [Sepsis: classification, clinical diagnostic concept, and treatment / Ed. by B.R. Gelfand. 4<sup>th</sup> ed., revised. Moscow: LLC "Medical information agency", 2017. 408 p. (In Russ.)]
6. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., Зотова Н.В. Фундаментально-прикладные аспекты системного воспаления с позиции теории физиологических и типовых патологических процессов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010. Т. 96, № 7. С. 696–707. [Chereshev V.A., Gusev E.Yu., Zotova N.V. Fundamental applied aspects of systemic inflammation in terms of physiologic and typical pathological process. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2010, vol. 96, no. 7, pp. 696–707. (In Russ.)]
7. Alcock J. The emperor has no clothes? searching for dysregulation in sepsis. *J. Clin. Med.*, 2018, vol. 7, no. 9: E247. doi: 10.3390/jcm7090247
8. Bezemer R., Bartels S.A., Bakker J., Ince C. Clinical review: clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill – where do we stand? *Critical Care*, 2012, vol. 16: 224. doi: 10.1186/cc11236
9. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1992, vol. 101, no. 6, pp. 1644–1655. doi: 10.1378/chest.101.6.1644
10. Carneiro A.H., Póvoa P., Gomes J.A. Dear Sepsis-3, we are sorry to say that we don't like you. *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, 2017, vol. 29, no. 1, pp. 4–8. doi: 10.5935/0103-507X.20170002
11. Cecconi M., Evans L., Levy M., Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet*, 2018, vol. 392, no. 10141, pp. 75–87. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2
12. Christaki E., Giamarellos-Bourboulis E.J. The complex pathogenesis of bacteremia: from antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host. *Virulence*, 2014, vol. 5, no. 1, pp. 57–65. doi: 10.4161/viru.26514
13. Churpek M.M., Snyder A., Han X., Sokol S., Pettit N., Howell M.D., Edelson D.P. Quick sepsis-related organ failure assessment, systemic inflammatory response syndrome, and early warning scores for detecting clinical deterioration in infected patients outside the intensive care unit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2017, vol. 195, no. 7, pp. 906–911. doi: 10.1164/rccm.201604-0854OC
14. Cortés-Puch I., Hartog C.S. Opening the debate on the new sepsis definition change is not necessarily progress: revision of the sepsis definition should be based on new scientific insights. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, vol. 194, no. 1, pp. 16–18. doi: 10.1164/rccm.201604-0734ED

15. Deppermann C., Kubes P. Platelets and infection. *Semin. Immunol.*, 2016, vol. 28, no. 6, pp. 536–545. doi: 10.1016/j.smim.2016.10.005
16. Fischetti V.A. Surface proteins on Gram-positive bacteria. *Microbiol. Spectr.*, 2019, vol. 7, no. 4. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0012-2018
17. Gaudette S., Hughes D., Boller M. The endothelial glycocalyx: structure and function in health and critical illness. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*, 2020, vol. 30, no. 2, pp. 117–134.
18. Godinjak A., Igljica A., Rama A., Tančica I., Jusufović S., Ajanović A., Kukuljac A. Predictive value of SAPS II and APACHE II scoring systems for patient outcome in a medical intensive care unit. *Acta Med. Acad.*, 2016, vol. 45, no. 2, pp. 97–103. doi: 10.5644/ama2006-124.165
19. Gusev E.Y., Zotova N.V. Cellular stress and general pathological processes. *Curr. Pharm. Des.*, 2019, vol. 25, no. 3, pp. 251–297. doi: 10.2174/1381612825666190319114641
20. Henning D.J., Puskarich M.A., Self W.H., Howell M.D., Donnino M.W., Yealy D.M., Jones A.E., Shapiro N.I. An emergency department validation of the SEP-3 sepsis and septic shock definitions and comparison with 1992 Consensus definitions. *Ann. Emerg. Med.*, 2017, vol. 70, no. 4, pp. 544–552.e5. doi: 10.1016/j.annemergmed.2017.01.008
21. Hernández G., Kattan E., Ospina-Tascón G., Bakker J., Castro R. Capillary refill time status could identify different clinical phenotypes among septic shock patients fulfilling Sepsis-3 criteria: a post hoc analysis of ANDROMEDA-SHOCK trial. *Intensive Care Med.*, 2020, vol. 46, no. 4, pp. 816–818. doi: 10.1007/s00134-020-05960-4
22. Horak J., Martinkova V., Radej J., Matejovič M. Back to basics: recognition of sepsis with new definition. *J. Clin. Med.*, 2019, vol. 8, no. 1: 1838. doi: 10.3390/jcm8111838
23. Hurley J.C., Nowak P., Öhrmalm L., Gogos C., Armaganidis A., Giamarellos-Bourboulis E.J. Endotoxemia as a diagnostic tool for patients with suspected bacteremia caused by Gram-negative organisms: a meta-analysis of 4 decades of studies. *J. Clin. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 4, pp. 1183–1191. doi: 10.1128/JCM.03531-14
24. Jacobs L., Wong H.R. Emerging infection and sepsis biomarkers: will they change current therapies? *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, 2016, vol. 14, no. 10, pp. 929–941. doi: 10.1080/14787210.2016.1222272
25. Kawasaki T. Update on pediatric sepsis: a review. *J. Intensive Care*, 2017, vol. 5: 47. doi: 10.1186/s40560-017-0240-1
26. Langley R.J., Wong H.R. Early diagnosis of sepsis: is an integrated omics approach the way forward? *Mol. Diagn. Ther.*, 2017, vol. 21, no. 5, pp. 525–537. doi: 10.1007/s40291-017-0282-z
27. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G. International sepsis definitions conference 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. *Intensive Care Med.*, 2003, vol. 29, no. 4, pp. 530–538. doi: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B
28. Lin G.L., McGinley J.P., Drysdale S.B., Pollard A.J. Epidemiology and immune pathogenesis of viral sepsis. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2147. doi: 10.3389/fimmu.2018.02147
29. Macdonald S.P.J., Kinnear F.B., Arendts G., Ho K.M., Fatovich D.M. Near-infrared spectroscopy to predict organ failure and outcome in sepsis: the assessing risk in sepsis using a tissue oxygen saturation (ARISTOS) study. *Eur. J. Emerg. Med.*, 2019, vol. 26, no. 3, pp. 174–179. doi: 10.1097/MEJ.0000000000000535
30. Maharaj B., Coovadia Y., Vayej A.C. An investigation of the frequency of bacteraemia following dental extraction, tooth brushing and chewing. *Cardiovasc. J. Afr.*, 2012, vol. 23, no. 6, pp. 340–344. doi: 10.5830/CVJA-2012-016
31. Marik P.E., Taeb A.M. SIRS, qSOFA and new sepsis definition. *J. Thorac. Dis.*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 943–945. doi: 10.21037/jtd.2017.03.125
32. Marshall J., Agniel D., Fraser V.J., Doherty J., Warren D.K. Gram-negative bacteraemia in non-ICU patients: factors associated with inadequate antibiotic therapy and impact on outcomes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, vol. 61, no. 6, pp. 1376–1383. doi: 10.1093/jac/dkn104
33. Marshall J.C., Vincent J.-L., Fink M.P., Cook D.J., Rubenfeld G., Foster D., Fisher C.J.Jr., Faist E., Reinhart K. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25–26, 2000. *Crit. Care Med.*, 2003, vol. 31, no. 5, pp. 1560–1567. doi: 10.1097/01.CCM.0000065186.67848.3A
34. Mat-Nor M.B., Md Ralib A., Abdulah N.Z., Pickering J.W. The diagnostic ability of procalcitonin and interleukin-6 to differentiate infectious from noninfectious systemic inflammatory response syndrome and to predict mortality. *J. Crit. Care*, 2016, vol. 33, pp. 245–251. doi: 10.1016/j.jcrc.2016.01.002
35. McGovern M., Giannoni E., Kuester H., Turner M.A., van den Hoogen A., Bliss J.M., Koenig J.M., Keij F.M., Mazela J., Finnegan R., Degtyareva M., Simons S.H.P., de Boode W.P., Strunk T., Reiss I.K.M., Wynn J.L., Molloy E.J. Challenges in developing a consensus definition of neonatal sepsis. *Pediatr. Res.*, 2020, vol. 88, pp. 14–26. doi: 10.1038/s41390-020-0785-x
36. McLymont N., Glover G.W. Scoring systems for the characterization of sepsis and associated outcomes. *Ann. Transl. Med.*, 2016, vol. 4, no. 24: 527. doi: 10.21037/atm.2016.12.53
37. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10229, pp. 1033–1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0
38. Minasyan H. Sepsis and septic shock: pathogenesis and treatment perspectives. *J. Crit. Care*, 2017, vol. 40, pp. 229–242. doi: 10.1016/j.jcrc.2017.04.015
39. Mtaweh H., Trakas E.V., Su E., Carcillo J.A., Aneja R.K. Advances in monitoring and management of shock. *Pediatr. Clin. North Am.*, 2013, vol. 60, no. 3, pp. 641–654. doi: 10.1016/j.pcl.2013.02.013
40. Niebauer J., Volk H.D., Kemp M., Dominguez M., Schumann R.R., Rauchhaus M., Poole-Wilson P.A., Coats A.J., Anker S.D. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*, 1999, vol. 353, no. 9167, pp. 1838–1842. doi: 10.1016/S0140-6736(98)09286-1
41. Opal S.M. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.*, 2005, vol. 6, no. 3, pp. 55–60. doi: 10.1097/01.PCC.0000161580.79526.4C
42. Pierrakos C., Vincent J.-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care*, 2010, vol. 14, no. 1: R15. doi: 10.1186/cc8872

43. Pietzner M., Kaul A., Henning A.K., Kastenmüller G., Artati A., Lerch M.M., Adamski J., Nauck M., Friedrich N. Comprehensive metabolic profiling of chronic low-grade inflammation among generally healthy individuals. *BMC Med.*, 2017, vol. 15, no. 1: 210. doi: 10.1186/s12916-017-0974-6
44. Radeva M.Y., Waschke J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 2018, vol. 222, no. 1. doi: 10.1111/apha.12860
45. Raeyen P., Zipperle J., Drechsler S. Extracellular vesicles as markers and mediators in sepsis. *Theranostics*, 2018, vol. 8, no. 12, pp. 3348–3365. doi: 10.7150/thno.23453
46. Rodríguez-Baño J., López-Prieto M.D., Portillo M.M., Retamar P., Natera C., Nuño E., Herrero M., del Arco A., Muñoz A., Téllez F., Torres-Tortosa M., Martín-Aspas A., Arroyo A., Ruiz A., Moya R., Corzo J.E., León L., Pérez-López J.A., SAEI/SAMPAC Bacteraemia group. Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, vol. 16, no. 9, pp. 1408–1413. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03089.x
47. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper-Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, vol. 315, no. 8, pp. 801–810. doi: 10.1001/jama.2016.0287
48. Spahn D.R., Bouillon B., Cerny V., Duranteau J., Filipescu D., Hunt B.J., Komadina R., Maegele M., Nardi G., Riddez L., Samama C.M., Vincent J.L., Rossaint R. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition. *Crit. Care*, 2019, vol. 23, no. 1: 98. doi: 10.1186/s13054-019-2347-3
49. Standl T., Annecke T., Cascorbi I., Heller A.R., Sabashnikov A., Teske W. The nomenclature, definition and distinction of types of shock. *Dtsch Arztebl. Int.*, 2018, vol. 115, no. 45, pp. 757–768. doi: 10.3238/arztebl.2018.0757
50. Su M., West C.A., Young A.J., He C., Konerding M.A., Mentzer S.J. Dynamic deformation of migratory efferent lymph-derived cells “trapped” in the inflammatory microcirculation. *J. Cell Physiol.*, 2003, vol. 194, no. 1, pp. 54–62. doi: 10.1002/jcp.10190
51. Suffredini A.F., Munford R.S. Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *JAMA*, 2011, vol. 306, no. 2, pp. 194–199. doi: 10.1001/jama.2011.909
52. Tao X., Wang H., Min C., Yu T., Luo Y., Li J., Hu Y., Yan Q., Liu W.E., Zou M. A retrospective study on Escherichia coli bacteraemia in immunocompromised patients: microbiological features, clinical characteristics, and risk factors for shock and death. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020, vol. 34, no. 8: e23319. doi: 10.1002/jcla.23319
53. Tomás I., Alvarez M., Limeres J., Potel C., Medina J., Diz P. Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Dis.*, 2007, vol. 13, no. 1, pp. 56–62. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01247.x
54. Vincent J.L. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you... *Crit. Care Med.*, 1997, vol. 25, no. 2, pp. 372–374. doi: 10.1097/00003246-199702000-00029
55. Wittekind C., Gradistanac T. Post-mortem examination as a quality improvement instrument. *Dtsch Arztebl. Int.*, 2018, vol. 115, no. 39, pp. 653–658. doi: 10.3238/arztebl.2018.0653
56. Wu F., Peng Z., Park P.W., Kozar R.A. Loss of syndecan-1 abrogates the pulmonary protective phenotype induced by plasma after hemorrhagic shock. *Shock*, 2017, vol. 48, no. 3, pp. 340–345. doi: 10.1097/SHK.0000000000000832
57. Yang N., Shi X.L., Zhang B.L., Rong J., Zhang T.N., Xu W., Liu C.F. The trend of  $\beta_3$ -adrenergic receptor in the development of septic myocardial depression: a lipopolysaccharide-induced rat septic shock model. *Cardiology*, 2018, vol. 139, no. 4, pp. 234–244. doi: 10.1159/000487126
58. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10229, pp. 1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
59. Zotova N.V., Chereshev V.A., Gusev E.Yu. Systemic Inflammation: methodological approaches to identification of the common pathological process. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 5: e0155138. doi: 10.1371/journal.pone.0155138
60. Zotova N.V., Zhuravleva Y.V., Zubova T.E., Gusev E.Yu. Integral estimation of systemic inflammatory response under sepsis. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2020, vol. 39, no. 1, pp. 13–26. doi: 10.4149/gpb\_2019043

**Авторы:**

**Гусев Е.Ю.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии воспаления ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия;

**Зотова Н.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия; доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия;

**Черешнев В.А.**, академик РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия.

**Authors:**

**Gusev E.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Zotova N.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation;

**Chereshev V.A.**, RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Research Supervisor of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russian Federation.

# ВЛИЯНИЕ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 1Н-ИНДОЛ-4-, -5-, -6-, -7-ИЛАМИНОВ

А.А. Масейкина<sup>1</sup>, И.С. Степаненко<sup>1</sup>, С.А. Ямашкин<sup>2</sup>, Е.Д. Слостников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева, г. Саранск, Россия

**Резюме.** Исследование новых противомикробных соединений включает определение механизма их воздействия на микробную клетку. Как правило, действие большинства современных синтетических противомикробных препаратов связано либо с подавлением синтеза ДНК, либо с подавлением бактериального белкового синтеза на уровне трансляции или транскрипции. Существуют чувствительные и простые методы скрининга и мониторинга потенциальной генотоксической активности широкого спектра природных и синтетических соединений. До настоящего времени широко применялся тест Эймса, основанный на чувствительности штаммов сальмонелл к канцерогенным химическим веществам, хотя некоторые соединения, вызывающие негативные реакции по Эймсу, на самом деле могли быть канцерогенными для животных. Другой метод, *SOS*-хромотест, — это *SOS*-транскрипционный анализ, способный оценить повреждение ДНК, вызванное химическими и физическими мутагенами. Он измеряет экспрессию репортерного гена ( $\beta$ -галактозидазы). Фермент  $\beta$ -галактозидаза перерабатывает ортонитрофенил галактопиранозид с образованием желтого соединения, обнаруживаемого при 420 нм. Затем индукцию  $\beta$ -галактозидазы нормализуют по активности щелочной фосфатазы — фермента, экспрессируемого конститутивно *Escherichia coli*. *SOS*-хромотест также широко используется для генотоксикологических исследований. Ответ быстрый (несколько часов) и не требует выживания тестерного штамма. Кривые «доза–эффект» для различных химических веществ включают линейную область. Наклон этой области принимается за меру индукции *SOS*. Поэтому для нашего исследования выбран *SOS*-хромотест, позволяющий выявить ДНК-опосредованное действие исследуемых соединений. Целью работы стала оценка *SOS*-индуцирующей активности противомикробных соединений на основе замещенных 1Н-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов. В качестве тестерного штамма в исследовании использован штамм *Escherichia coli* PQ 37 с генотипом *F-thr leu his-4 pyrD thi galE galK lacΔU169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfiA::Mud (Ap, lac) cts*. Благодаря присутствию «сшивки» генов *sfiA::lacZ*, экспрессия гена  $\beta$ -галактозидазы *lacZ* в штамме PQ 37 находится под контролем промотора гена *sfiA*, одного из компонентов *SOS*-регулона *E. coli*. Показателем *SOS*-индуцирующей активности исследуемых соединений в *SOS*-хромотесте является активность  $\beta$ -галактозидазы, которая оценивается относительно активности конститутивного фермента микроорганизмов — щелочной фосфатазы, что позволяет контролировать также токсический эффект исследуемых соединений на клетки бактерий. Результаты исследований показали, что

## Адрес для переписки:

Масейкина Алена Александровна  
430005, Россия, г. Саранск, Большевикская ул., 68,  
ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский  
государственный университет им. Н.П. Огарева.  
Тел.: 8 (951) 343-54-08.  
E-mail: minibat@mail.ru

## Contacts:

Alena A. Maseykina  
430005, Russian Federation, Saransk, Bolshevistskaya str., 68,  
National Research Ogarev Mordovia State University.  
Phone: +7 (951) 343-54-08.  
E-mail: minibat@mail.ru

## Для цитирования:

Масейкина А.А., Степаненко И.С., Ямашкин С.А., Слостников Е.Д.  
Влияние на генетический аппарат микробной клетки соединений  
на основе замещенных 1Н-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов // Инфекция  
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 663–670. doi: 10.15789/2220-7619-  
TEO-1451

## Citation:

Maseykina A.A., Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Slastnikov E.D. An impact  
of 1H-indol-4-, -5-, -6-, -7-ylamines-substituted compounds on the microbial  
cell genetic apparatus // Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i Immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 663–670. doi: 10.15789/2220-  
7619-TEO-1451

4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (1), 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (2) и *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (3) не обладают *SOS*-индуцирующей активностью в исследуемых концентрациях. 4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]-хинолин-2-он(4), 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло-[2,3-*f*]-хинолин-7-он (5), 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]-хинолин-8-он (6) и 1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]-хинолин-8-он (7) в бактерицидных концентрациях проявляли дозозависимую *SOS*-индуцирующую активность. Полученные результаты исследований позволили выявить соединения 4, 5, 6, 7, механизм действия которых включает воздействие на ДНК микробной клетки.

**Ключевые слова:** *SOS*-хромотест, щелочная фосфатаза, активность β-галактозидазы, фактор индукции *SOS*-ответа клетки, генотоксичность, антибактериальная активность.

## AN IMPACT OF 1*H*-INDOL-4-, -5-, -6-, -7-YLAMINES-SUBSTITUTED COMPOUNDS ON THE MICROBIAL CELL GENETIC APPARATUS

Maseykina A.A.<sup>a</sup>, Stepanenko I.S.<sup>a</sup>, Yamashkin S.A.<sup>b</sup>, Slastnikov E.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

<sup>b</sup>Mordovia State Pedagogical Institute named after M.E. Evseviev, Saransk, Russian Federation

**Abstract.** The study of new antimicrobial compounds includes determining the mechanism of their effect on the microbial cell. As a rule, an effect for the majority of current synthetic antimicrobials is associated either with suppressed DNA synthesis, or with inhibiting bacterial protein production at translational or transcriptional level. A number of sensitive and easy-to-do methods are available for screening and monitoring potential genotoxic activity of a wide range of natural and synthetic compounds. To date, the Ames test has been widely used, which is based on the sensitivity of Salmonella strains to carcinogenic chemicals, although some compounds resulting in Ames negative reactions could actually be carcinogenic to animals. Likewise, the *SOS* chromotest represents a *SOS* transcriptional analysis able to assess DNA damage caused by chemical and physical mutagens by measuring the expression of a reporter gene (β-galactosidase) encoding the β-galactosidase enzyme that metabolizes ortho-nitrophenyl galactopyranoside resulting in emerging a yellow-colored compound detected at wavelength 420 nm. Next, the induction of β-galactosidase is normalized by the activity of alkaline phosphatase, an enzyme expressed constitutively by *Escherichia coli*. *SOS* chromotest is also widely used for genotoxicological studies providing a quick answer (several hours) and requiring no survival of the test strain. Dose-response curves for various chemicals consist of a linear region, which slope corresponds to the *SOS* induction. Therefore, the *SOS* chromotest was selected for the study allowing to identify DNA-mediated effects of the analyzed compounds. The aim of the study was to evaluate the *SOS*-inducing activity for 1*H*-indol-4-, -5-, -6-, -7-ylamines-substituted antimicrobial compounds. The *Escherichia coli* PQ 37 with the genotype *F-thr leu his-4 pyrD thi galE lacΔU169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Mis+ sfiA::Mud (Ar, lac) cts* was used as a test strain. Due to the link of the *sfiA::lac Z* genes, *lacZ* β-galactosidase gene expression in the strain PQ 37 is controlled by the *sfiA* gene promoter, one of the components in the *E. coli* *SOS* regulon. Activity of β-galactosidase assessed relative to constitutive microbial alkaline phosphatase reflects *SOS*-inducing activity triggered by examined compounds in the *SOS* chromotest that also allows to control their toxic effects on bacterial cells. The data showed that 4,4,4-trifluoro-*N*-(6-methoxy-1,2,3-trimethyl-1*H*-indol-5-yl)-3-oxobutanamide (1), 4,4,4-trifluoro-*N*-(6-methyl-2-phenyl-1*H*-indol-5-yl)-3-oxobutanamide (2) and *N*-(1,5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-indol-6-yl)-4,4,4-trifluoro-3-oxobutanamide (3) exerted no *SOS*-inducing activity at the examined concentrations. In contrast, 4-Hydroxy-8-phenyl-4-(trifluoromethyl)-1,3,4,7-tetrahydro-2*H*-pyrrolo [2,3-*h*]-quinoli*N*-2-one (4), 9-hydroxy-5-methyl-2-phenyl-9-(trifluoromethyl)-1,6,8,9-tetrahydro-7*H*-pyrrolo-[2,3-*f*]-quinoli*N*-7-one (5), 6-hydroxy-2,3-dimethyl-6-(trifluoromethyl)-1,6,7,9-tetrahydro-8*H*-pyrrolo[3,2-*h*]quinoli*N*-8-one (6) and 1,2,3,9-tetramethyl-6-(trifluoromethyl)-1,9-dihydro-8*H*-pyrrolo [3,2-*h*]-quinoli*N*-8-one (7) displayed a dose-dependent *SOS*-inducing activity at bactericidal concentrations. The data obtained allowed us to identify compounds 4, 5, 6, 7, which mechanism of action relies on affecting microbial cell DNA.

**Key words:** *SOS* chromotest, alkaline phosphatase, β-galactosidase activity, induction factor of the *SOS* response of a cell, genotoxicity, antibacterial activity.

## Введение

Механизм действия многих современных синтетических противомикробных соединений заключается либо в подавлении синтеза нуклеиновых кислот, либо в подавлении синтеза бактериального белка на уровне трансляции или

транскрипции. Исследование влияния вновь синтезированных соединений на структуру нуклеиновых кислот на примере бактериальной ДНК важно как для установления молекулярных механизмов антибактериальной активности новых молекул, так и для подтверждения предположений об их вероятной генотоксичности [1].

Для определения механизма воздействия биологически активных молекул на дезоксирибонуклеиновую кислоту прокариотической клетки целесообразно применять тест-систему, в которой индукция *SOS*-оперонов при наличии разных концентраций исследуемого вещества определяется по абсолютному значению активности β-галактозидазы [1].

Прокариотическая *SOS*-система — это бактериальная защитная система, которая включается в ответ на критическое разрушение дезоксирибонуклеиновой кислоты и/или подавление репликации, активируя тем самым череду защитных реакций, к которым относится экспрессия огромного количества генов, запускающих функции клетки, осуществляемые специальными ферментными системами и определяющие способность исправлять повреждения и разрывы в молекулах ДНК. Это так называемый *SOS*-ответ клетки, включающий физиологические и репарационные изменения, вызываемые действием *SOS*-системы [3].

Интенсивность нарушения целостности ДНК или ингибирования репликации в общем зависит от нескольких факторов, в том числе и химического взаимодействия молекулы с ДНК, которое также представляет собой одну из ступеней биологического механизма, ведущего к мутациям. В настоящее время базовые процессы *SOS*-регулона прокариот, запускающие программу *SOS*-сигнала бактерий на изменение ДНК, уже идентифицированы [3].

*SOS*-ответ формируют следующие реакции: подавление клеточного деления и метаболизма, активация лизогенных профагов и *SOS*-восстановление ДНК. Результатом быстрого запуска *SOS*-ответа может быть «ошибочная» репликация ДНК, сохраняющаяся при дальнейшем делении клеток. Роль *UmuDC*-зависимой *SOS*-репарации такова, что при множественных дефектах ДНК, в случае отставания клетки от запуска начальной последовательности ДНК, она имеет свойство продолжать репликацию путем введения случайных оснований в синтезированную цепь поверх поврежденного участка, что сопровождается большим числом ошибок. Таким образом, индукция *SOS*-ответа влечет за собой значительное увеличение частоты мутаций. При полной потере жизненно важных функций такая клетка в конечном итоге погибнет. Если же мутации, которые возникли при «ошибочном» *SOS*-восстановлении, не летальны, то клетка выживает, но ее потомство будет передавать мутации, возникающие в процессе *SOS*-ответа [2].

Как итог, факторы, вызывающие *SOS*-ответ прокариотической клетки, либо имеют ДНК-повреждающую (генотоксическую) активность, либо ингибируют репликацию и могут вызывать так называемый *SOS*-мутагенез.

Цель данного исследования — тестирование *SOS*-индуцирующей активности новых соединений, с обнаруженной и доказанной противомикробной активностью, с использованием *SOS*-хромотеста [9].

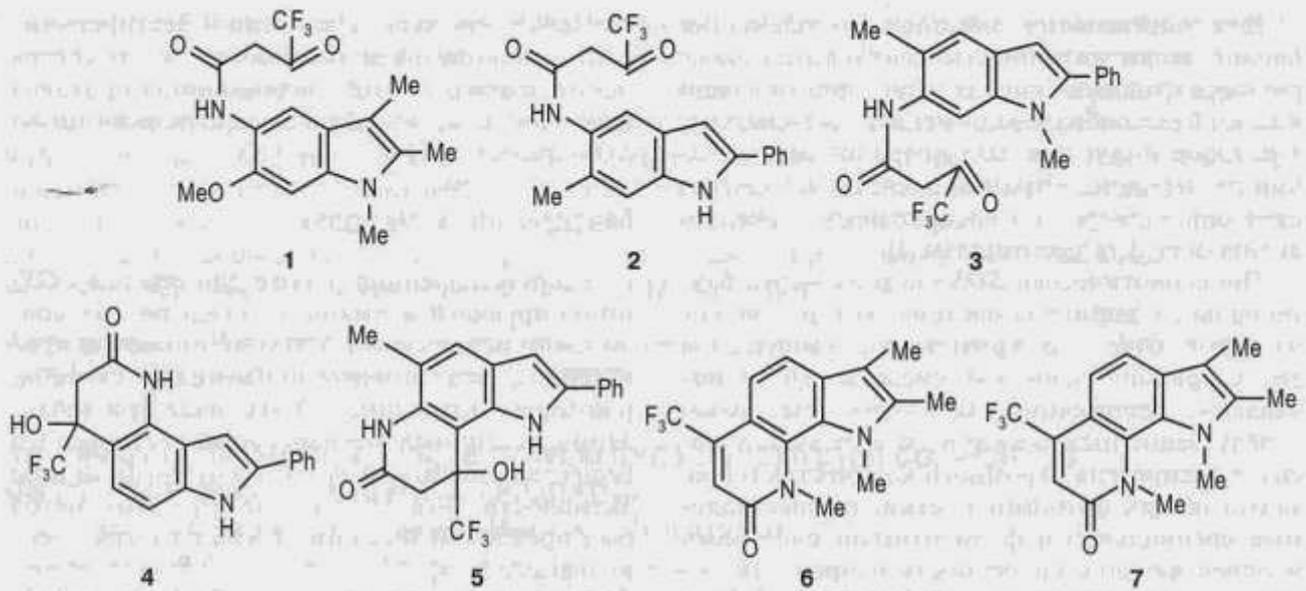
## Материалы и методы

В представленной работе для оценки *SOS*-индуцирующей активности исследуемых соединений использовался *SOS*-хромотест. В проведенном эксперименте применялась система, в которой активацию *SOS*-сигнала при добавлении различных концентраций тестируемого вещества оценивали по абсолютной величине активности β-галактозидазы [9]. Этот метод был предложен Филиппом Квилардетом и его коллегами [5, 6].

В качестве объектов исследования использовались следующие соединения на основе замещенных 1*H*-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов: 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (1) на основе 6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-иламина, 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (2) на основе 6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-иламина, *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (3) на основе 1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-иламина, 4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло [2,3-*h*]-хинолин-2-он (4) на основе 2-фенил-1*H*-индол-4-иламина, 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло[2,3-*f*]-хинолин-7-он (5) на основе 5-метил-2-фенил-1*H*-индол-6-иламина, 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]-хинолин-8-он (6) и 1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*] хинолин-8-он (7) на основе 2,3-диметил-1*H*-индол-7-иламина (рис.).

В качестве тестерного штамма в исследовании использован штамм *Escherichia coli* PQ 37 с генотипом *F-thr leu his-4 pyrD thi galE galK lacΔU169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfi A::Mud (Ap, lac) cts*. Изменение активности индуцибельного фермента β-галактозидазы, которое свидетельствует о *SOS*-индуцирующей активности тестируемых соединений, изучали посредством *SOS*-хромотеста. Активность индуцибельного фермента β-галактозидазы в данном тесте сравнивается с активностью конститутивного фермента щелочной фосфатазы. Это дает возможность определять уровень токсического воздействия исследуемых соединений на *SOS*-регулон прокариотической клетки [8].

Агаровая культура *E. coli* PQ37 переносится в пробирку с 5 мл *LB*-бульона с ампициллином (20 мкг/мл), культивируется при 37°C 12 ч. 12-ча-



**Рисунок. Соединения на основе замещенных 1*H*-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов**

Figure. Compounds based on substituted 1*H*-indol-4-, -5-, -6-, -7-ylamines

совая «ночная» культура тест-штамма разводится в соотношении 1/3 свежим LB-бульоном с ампициллином (20 мкг/мл) и подрашивается при 37°C с аэрацией (оптическая плотность суспензии должна соответствовать 0,4 ЕД при 600 нм). Затем бактериальная суспензия разливается по 0,9 мл в пробирки, содержащие 100 мкл раствора исследуемого соединения в разных концентрациях, ДМСО («негативный контроль»), раствор мутагена митомицина С (10 мкг/мл), являющегося индуктором SOS-ответа клетки («положительный контроль»). Пробирки инкубируются при 37°C 24 ч, после чего определяется активность ферментов: щелочной фосфатазы и β-галактозидазы. Для определения активности фермента щелочной фосфатазы микробная суспензия в объеме 300 мл смешивается с 2,7 мл Т-буфера, а затем измеряется оптическая плотность раствора при длине волны 600 нм с помощью спектрофотометра (Shimadzu UV-1800, Япония). В пробирки добавляется 0,15 мл хлороформа и 0,1 мл 0,1%-ного додецилсульфата натрия, полученная смесь инкубируется на водяной бане 5 мин при 28°C. В пробирки с лизатами клеток добавляется 600 мкл раствора *N*-нитрофенилфосфата. Полученную смесь инкубируют 30 мин при комнатной температуре, а затем к смеси добавляется 1 мл 2М НСl и через 5 мин — 1 мл 2М Tris. Измеряется оптическая плотность каждой смеси при длинах волн 420 и 550 нм соответственно. Далее активность фермента щелочной фосфатазы рассчитывается по формуле (1) [6]:

$$A = \frac{D_{420} - 1,75 \times D_{550}}{t \times V \times D_{600}} \times 1000, \quad (1)$$

где 1,75 — поправочный коэффициент;  $D_{420}$ ,  $D_{550}$ ,  $D_{600}$  — соответствующие значения оптической плотности для реакционной смеси;  $t$  — время реакции (мин);  $V$  — объем культуры, взятой для определения (мл).

Для определения активности фермента β-галактозидазы микробную суспензию в объеме 300 мл смешивают с 2,7 мл Т-буфера, затем измеряется оптическая плотность раствора при длине волны 600 нм. В пробирки добавляется 0,15 мл хлороформа и 0,1 мл 0,1%-ного додецилсульфата натрия, после полученная смесь инкубируется на водяной бане 5 мин при 28°C. Затем пробирки со смесями сильно встряхивают. В пробирки с лизатами клеток добавляется *o*-нитрофенилгалактопиранозид, и полученную смесь инкубируется 30 мин при комнатной температуре. К смеси добавляется 2 мл 1М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , и измеряется оптическая плотность каждой смеси при длинах волн 420 и 550 нм. Активность фермента β-галактозидазы рассчитывается по формуле (1) [7]. Для количественной оценки SOS-ответа используют показатель IF (фактор индукции SOS-ответа клетки), который определяется по формуле (2) [6]:

$$IF = \frac{R(O)}{R(C)}, \quad (2)$$

где

$$R(O) = \frac{\text{Активность } \beta\text{-галактозидазы в опыте}}{\text{Активность щелочной фосфатазы в опыте}}$$

$$R(C) = \frac{\text{Активность } \beta\text{-галактозидазы в контроле}}{\text{Активность щелочной фосфатазы в контроле}}$$

Если показатель  $IF > 2$  (фактор индукции *SOS*-ответа клетки), то это свидетельствует о способности исследуемого соединения оказывать ДНК-повреждающее действие или нарушать или тормозить репликацию ДНК прокариотической клетки [5].

## Результаты

Значение коэффициента индукции *SOS*-ответа соединения 5 оказалось ниже порогового значения при концентрациях 50 мкг/мл, где составило 1,2, и 500 мкг/мл, где составило 1,8. Увеличение концентрации исследуемого циклического амида 5 до 1000 мкг/мл вызвало изменение значения *IF*, которое превысило пороговый уровень «2» и составило 3,2. Испытуемое соединение 5 в концентрации 1000 мкг/мл повышало активность  $\beta$ -галактозидазы ( $p < 0,05$ ) (табл.). Амид 1 в исследуемых концентрациях ДНК не оказал статистически значимого эф-

фекта на активность индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы. Для исследуемого соединения 1 в концентрации от 50 до 1000 мкг/мл коэффициент индукции *SOS*-ответа был ниже порогового уровня «2».

Показатель коэффициента индукции *SOS*-ответа соединения 6 при концентрации 50 мкг/мл не превышал порогового значения и составил 1,3. Увеличение концентрации циклического амида 6 до 500 мкг/мл вызвало превышение порогового уровня значения *IF* и составляло 2,8. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого соединения 6 выявило дозозависимое увеличение показателя *IF* до 6,7. Анализируемый циклический амид статистически достоверно увеличивал активность индуцибельного фермента  $\beta$ -галактозидазы в концентрации 500 и 1000 мкг/мл.

Коэффициент индукции *SOS*-ответа пирролохинолона 7 оказался ниже порогового значения и составил 1,9 при использовании исследуе-

**Таблица. *SOS*-индуцирующая активность исследуемых соединений**

Table. *SOS*-inducing activity of the studied compounds

Исследуемое соединение Test compound	Доза, мкг/мл Dose, $\mu\text{g/ml}$	$\beta$ -галактозидаза, ЕД $\beta$ -galactosidase, ED	Щелочная фосфатаза, ЕД Alkaline phosphatase, EU	Фактор индукции <i>SOS</i> -ответа ( <i>IF</i> ) SOS response induction factor ( <i>IF</i> )
Негативный контроль Negative control	-	246,3 $\pm$ 27,0	1453,3 $\pm$ 94,8	-
Митомycin C Mitomycin C	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02
5	50	243,4 $\pm$ 31,3	1290,8 $\pm$ 185,9	1,2
	500	399,2 $\pm$ 78,9	1315,2 $\pm$ 218,9	1,8
	1000	946,5 $\pm$ 34,6*	1682, 5 $\pm$ 73,1	3,2
1	50	173,5 $\pm$ 7,55	1575,5 $\pm$ 238,1	1
	500	192,6 $\pm$ 4,6	1506,1 $\pm$ 41,4	1,1
	1000	187,7 $\pm$ 6,3	1417,9 $\pm$ 133,9	1,17
6	50	246,0 $\pm$ 9,2	1636,6 $\pm$ 172,1	1,3
	500	532,1 $\pm$ 121,9*	1098,9 $\pm$ 386,0	2,8
	1000	1055,9 $\pm$ 94,2*	1387,9 $\pm$ 44,4	6,7
7	50	336,2 $\pm$ 12,7	1575,6 $\pm$ 194,0	1,9
	500	333,0 $\pm$ 22,1	1000,5 $\pm$ 107,9	3,1
	1000	591,0 $\pm$ 76,8*	1287,6 $\pm$ 130,9	3,8
3	50	211,2 $\pm$ 9,3	1188,4 $\pm$ 135,9	1,7
	500	211,2 $\pm$ 58,5	990,07 $\pm$ 99,2	2,1
	1000	224,9 $\pm$ 79,2	1132,6 $\pm$ 75,1	2
4	50	282,9 $\pm$ 39,9	868,4 $\pm$ 27,9	1
	500	640,43 $\pm$ 51,7	938,82 $\pm$ 60,8	2
	1000	1004,53 $\pm$ 113,3*	854,14 $\pm$ 41,6	3,1
2	50	297,1 $\pm$ 72,8	1019,5 $\pm$ 44,1	0,9
	500	279,1 $\pm$ 37,8	855,2 $\pm$ 47,6	0,9
	1000	276,3 $\pm$ 45,4	954,2 $\pm$ 57,2	0,9

Примечание. \* — отличие от контроля статистически достоверно при  $p < 0,05$ .

Note: \* — a significant difference compared to control is set at  $p < 0.05$ .

мого соединения в концентрации 50 мкг/мл. Увеличение концентрации пирролохинолона 7 до 500 мкг/мл показало изменение значения ИФ: оно превысило пороговый уровень «2» и составило 3,1. Исследуемое соединение 7 проявило дозозависимый *SOS*-индуцирующий эффект, но его способность вызывать *SOS*-ответ оказалась менее выражена, чем у циклического амида 6, а ИФ пирролохинолона 7 составил 3,8. Пирролохинолон 7 в концентрации 1000 мкг/мл увеличивал активность фермента  $\beta$ -галактозидазы ( $p < 0,05$ ).

Нециклический амид 3 в концентрации 50 мкг/мл не изменял значение коэффициента индукции *SOS*-ответа, оно было ниже порогового и составило 1,7. Увеличение концентрации амида 3 до 500 мкг/мл выявило превышение порогового уровня «2», и значение ИФ составило 2,1. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого соединения 3 до 1000 мкг/мл выявило лишь тенденцию к увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы, а значение ИФ оставалось на уровне 2,0.

Циклический амид 4 в концентрации 50 мкг/мл не влиял на значение фактора индукции *SOS*-ответа, показатель ИФ оказался ниже порогового значения и составил 1,0. С увеличением концентрации (до 500 мкг/мл) циклического амида 4 значение ИФ составило 2,0. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого соединения 4 выявило дозозависимое увеличение показателя ИФ, которое составило 3,1. Циклический амид 4 достоверно увеличивал активность  $\beta$ -галактозидазы в концентрации 500 и 1000 мкг/мл ( $p < 0,05$ ).

На фоне использования амида 2 в исследуемых концентрациях индукции *SOS*-функций у тестируемого микроорганизма не выявлено. Нециклический амид 2 в концентрациях 50, 500, 1000 мкг/мл не оказывал влияния на активность  $\beta$ -галактозидазы тест-штамма *Escherichia coli* PQ 37.

## Обсуждение

Вышеописанные результаты дают возможность охарактеризовать вновь синтезированную группу соединений как неоднородную в отношении *SOS*-регулона прокариот. Ранее показано, что соединения из группы производных замещенных 1*H*-индол-5-иламинов менее активны в отношении микроорганизмов, вызывающих неспецифические и некоторые специфические инфекционные заболевания человека [9]. Результаты *SOS*-хромотеста продемонстрировали, что производные замещенных 1*H*-индол-5-иламинов, амиды 1 и 2, не обладают *SOS*-индуцирующей способностью в исследуемых концентрациях. В присутствии замещенного производного 1*H*-индол-6-

иламина 3 наблюдается тенденция к повышению активности  $\beta$ -галактозидазы в концентрации 1000 мкг/мл, но статистически значимого изменения значения фактора индукции *SOS*-ответа нет. Циклический амид 4, соединение на основе 2-фенил-1*H*-индол-6-иламина, оказывал дозозависимое влияние на активность  $\beta$ -галактозидазы тест-штамма *E. coli* PQ 37 ( $p < 0,05$ ). Биологически активные производные замещенных 1*H*-индол-6-иламина (циклический амид 5) и 2,3-диметил-1*H*-индол-7-иламина (циклический амид 6) и пирролохинолин 7, индукции *SOS*-сигнала у тестируемого штамма *Escherichia coli* в концентрации 50 мкг/мл не демонстрировали, а при более высоких концентрациях, которые являются бактерицидными, показали *SOS*-индуцирующую активность, что свидетельствует об их влиянии на ДНК прокариотических клеток.

Учитывая доказанный бактериостатический тип действия исследуемых соединений в минимальных подавляющих концентрациях (МПК) [4], можно сделать предположение, что механизм действия, который включает разрушающее влияние на клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану прокариот и опосредует гибель микроорганизма, не является основным антимикробным механизмом группы изучаемых производных 1*H*-индол-4-, -5-, -6-, -7-иламинов. При концентрациях 50, 500 мкг/мл исследуемые соединения не вызывали *SOS*-ответа микробной клетки, но при концентрациях 1000 мкг/мл соединения с широким спектром антимикробной активности [9] проявляли дозозависимый *SOS*-индуцирующий эффект.

Ни одно из исследуемых соединений не оказывало эффект, сравнимый с «положительным контролем» — известным мутагеном митомицином С, показатель ИФ которого составлял 7,2.

## Заключение

Экспериментальное исследование *SOS*-индуцирующей активности новых соединений с доказанной противомикробной активностью с использованием *SOS*-хромотеста, свидетельствует о том, что одним из механизмов биологического действия изучаемых соединений является воздействие на ДНК микробной клетки. При бактерицидных концентрациях соединения производные замещенных 1*H*-индол-4-, -6-, -7-иламинов способны воздействовать на ДНК прокариотических микроорганизмов, в бактериостатических концентрациях они и производные замещенных 1*H*-индол-5-иламинов, предположительно, имеют дополнительный механизм действия на микробную клетку. Полученные нами данные могут послужить материалом для будущих исследований.

## Список литературы/References

1. Бояршинов В.Д., Михалев А.И., Ухов С.В., Новикова В.В., Данилов Ю.Л. Синтез и противомикробная активность эфиров и амидов пиридин-2-карбоновой кислоты // *Фундаментальные исследования*. 2014. Ч. 1. № 11. С. 105–109. [Boyarshtinov V.D., Mihalev A.I., Ukhov S.V., Novikova V.V., Danilov Yu.L. Synthesis and antimicrobial activity of pyridine-2-carboxylic acid esters and amides. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Researches*, 2014, pt. 1, no. 11, pp. 105–109. (In Russ.)]
2. Кадималиев Д.А., Степаненко И.С., Надежина О.С., Ямашкин С.А. Влияние различно замещенных пирролохинолонов на физиолого-биохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* // *Микология и фитопатология*. 2014. Т. 48, № 5. С. 309–314. [Kadimaliev D.A., Stepanenko I.S., Nadezhina O.S., Yamashkin S.A. Influence of variously substituted pyrroloquinolones on physiological and biochemical characteristics of the lignolytic fungus *Lentinus tigrinus*. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*, 2014, vol. 48, no. 5, pp. 309–314. (In Russ.)]
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике / Под ред. С.И. Алиханяна. М.: Мир, 1976. 436 с. [Miller D. Experiments in molecular genetics. Ed. by S.I. Alikhanyan. Moscow: Mir, 1976. 436 p. (In Russ.)]
4. Патент № 2227140 Российская Федерация, МПК C07D 209/16. Способ получения серотонина и его фармакологических солей: № 2002128129; заявлено 2002.10.22; опубликовано 2004.04.27 / Алферов А.В., Северин Е.С., Крюков Л.Н. Патентообладатель: ЗАО «Лорр». [Patent No. 2227140 Russian Federation, Int. Cl. C07D 209/16. Method of production of serotonin and serotonin salts. No. 2002128129; application: 2002.10.22; date of publication 2004.04.27 / Alferov A.V., Severin E.S., Krjukov L.N., Panov A.E., Vorontsov E.A., Kuznetsov S.L., Mikerin I.E. Proprietors: Lorr Ltd.]
5. Патент № 2404982 Российская Федерация, МПК C07D 471/04 (2006.01), A61K 31/4439 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 31/06 (2006.01). Применение пирролохинолиновых соединений для уничтожения клинически латентных микроорганизмов: № 2008122912/04; заявлено 2006.08.11; опубликовано 2010.11.27 / Бек П.Х., Браун М.Б., Кларк Д.Е., Коутес Э., Дайк Х.Д., Ху Я., Лондесбро Д.Д., Миллс К., Паллин Т.Д., Рейд Г.П., Стодарт Г. Патентообладатель: Хелперби терапиястикс лимитед. 122 с. [Patent No. 2404982 Russian Federation, Int. Cl. C07D 471/04 (2006.01), A61K 31/4439 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 31/06 (2006.01). Application of pyrroloquinoline compounds for killing clinically latent microorganisms. No. 2008122912/04; application: 2006.08.11; date of publication 2010.11.27 / Bek P.H., Braun M.B., Klark D.E., Coates A., Dyke H.J., Hu Y., Londesbrough D.J., Mills K., Pallin Th.D., Reid G.P., Stoddart G. Proprietors: Helperby therapeutics limited. 122 p.]
6. Рогачева А.В., Празднова Е.В., Мазанко М.С., Чистяков В.А. Ингибирование SOS-репарации у бактерий // *Актуальная биотехнология*. 2017. № 2. С. 77–79. [Rogacheva A.V., Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Chistyakov V.A. Inhibition of SOS repair in bacteria. *Aktual'naya biotekhnologiya = Current Biotechnology*, 2017, no. 2, pp. 77–79. (In Russ.)]
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines for Conducting Preclinical Trials of Medicines. Part one / Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Griff and K, 2012. 944 p. (In Russ.)]
8. Садовникова М.С., Беликов В.М. Пути применения аминокислот в промышленности // *Успехи химии*. 1978. Т. 47, № 2. С. 357–383. [Sadovnikova M.S., Belikov V.M. Ways of using amino acids in industry. *Uspekhi khimii = Advances in Chemistry*, 1978, vol. 47, no. 2, pp. 357–383. doi: 10.1070/RC1978v047n02ABEH002212 (In Russ.)]
9. Сафарова А.Я., Гицу Г.А., Михайлицин Ф.С., Севбо Д.П., Трусов С.Н. Получение салициламида МСТ-28 и изучение противогименолепидозной активности // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2015. № 2. С. 41–42. [Safarova A.Ya., Gicu G.A., Mihajlicyn F.S., Sevbo D.P., Trusov S.N. Preparation of salicylamide MST-28 and study of antihymenolepidosis activity. *Medicinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2015, no. 2, pp. 41–42. (In Russ.)]
10. Ушаков В.Ю. SOS-система репараций ДНК у бактерий (обзор) // *Вестник Пермского университета*. 2010. № 2. С. 19–30. [Ushakov V.Yu. SOS-system repair system in bacteria (review). *Vestnik Permskogo universiteta = Perm University Bulletin*, 2010, no. 2, pp. 19–30. (In Russ.)]
11. Alyamkina E.A., Yamashkin S.A., Stepanenko I.S., Yurovskaya M.A. 4-Amino-2-phenylindole-based compounds with potential antibacterial activity. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2017, vol. 72, no. 1, pp. 24–28. doi: 10.3103/S0027131417010023
12. Barrett T.C., Mok W.W., Murawski A.M., Brynildsen M.P. Enhanced antibiotic resistance development from fluoroquinolone persists after a single exposure to antibiotic. *Nat. Commun.*, 2019, vol. 10, no. 1: 1177. doi: 10.1038/s41467-019-09058-4
13. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N., Sherratt D.J., Sandler S.J., Marians K.J. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, 2000, vol. 404, no. 6773, pp. 37–41. doi: 10.1038/35003501
14. Hooper D.C. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, vol. 32, no. 1, pp. S9–S15. doi: 10.1086/319370
15. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, pp. 423–435. doi: 10.1038/nrmicro2333
16. Koonin E.V., Makarova K.S., Wolf Y.I. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 71, pp. 233–261. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093830
17. Kreuzer K.N. DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *CSH Perspectives in Biology*, 2013, vol. 5, no. 11: a012674. doi: 10.1101/cshperspect.a012674
18. Maeda T., Horinouchi T., Sakata N., Sakai A., Furusawa C. High-throughput identification of the sensitivities of an *Escherichia coli*  $\Delta$  recA mutant strain to various chemical compounds. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2019, vol. 72, no. 7, pp. 566–573. doi: 10.1038/s41429-019-0160-5
19. Mersch-Sundermann V., Kern S., Wintermann F. Genotoxicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and related structures on *Escherichia coli* PQ37 (SOS-Chromotest). *Environ. Mol. Mutagen.*, 1991, no. 18, pp. 41–50. doi: 10.1002/em.2850180108
20. Quillardet P., Hofnung M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mut. Res.*, 1985, vol. 147, no. 3, pp. 65–78. doi: 10.1016/0165-1161(85)90020-2

21. Quillardet P., Huisman O., Ari R.D., Hofnung M. SOS-chromotest, a direct assay of a SOS-function in Escherichia coli K12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, no. 19, pp. 5971–5975. doi: 10.1073/pnas.79.19.5971
22. Russell A.D., Hugo W.B., Ayliffe's G.A.J., Fraise A.P., Lambert P.A. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 4<sup>th</sup> ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004. 689 p. doi: 10.1002/9781118425831
23. Sanyal G., Doig P. Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. 327–339. doi: 10.1517/17460441.2012.660478
24. Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Kostina Y.A., Batarsheva A.A., Mironov M.A. A new group of compounds derived from 4-, 5-, 6- and 7-aminoindoles with antimicrobial activity. *Res. Results Pharmacol.*, 2018, vol. 4, no. 3, pp. 17–26. doi: 10.3897/rrpharmacology.4.29905
25. Stepanenko I.S., Yamashkin S.A., Kostina Y.A., Slastnikov E.D., Batarsheva A.A. A study of the type of antimicrobial action of novel compounds synthesized from substituted benzaminoindoles. *Bulletin of RSMU*, 2019, no. 2, pp. 57–64. doi: 10.24075/brsmu.2019.030
26. Sutton M.D., Smith B.T., Godoy V.G., Walker G.C. The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu. Rev. Genet.*, 2000, vol. 34, pp. 479–497. doi: 10.1146/annurev.genet.34.1.479
27. Yamashkin S.A., Oreshkina E.A., Romanova I.S., Yurovskaya M.A. The potential use 6-amino-5-methoxy(methyl)-2,3-dimethyl- and 6-amino-5-methoxy(methyl)-1,2,3-trimethylindoles in synthesis pyrrolo[2,3-f]quinolines. *Chem. Heterocycl. Comd.*, 2006, vol. 42, no. 1, pp. 86–91. doi: 10.1002/chin.200641152
28. Yamashkin S.A., Oreshkina E.A., Yurovskaya M.A. Reaction of 2,3-dimethyl- and 1,2,3-trimethyl-6-amino-indoles with ethyl 4,4,4-trifluoroacetate. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2007, vol. 62, no. 2, pp. 105–108. doi: 10.3103/S0027131407020113

**Авторы:**

**Масейкина А.А.**, аспирант кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

**Степаненко И.С.**, д.м.н., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

**Ямашкин С.А.**, д.х.н., профессор кафедры химии, технологии и методики обучения ФГБОУ ВО Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева, г. Саранск, Россия;

**Сластников Е.Д.**, студент ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия.

**Authors:**

**Maseykina A.A.**, PhD Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

**Stepanenko I.S.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

**Yamashkin S.A.**, PhD, MD (Chemistry), Professor, Department of Chemistry, Technology and Methods of Training, Mordovia State Pedagogical Institute named after M.E. Evsevieva, Saransk, Russian Federation;

**Slastnikov E.D.**, Student, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.04.2020  
Отправлена на доработку 21.05.2020  
Принята к печати 04.07.2020

Received 09.04.2020  
Revision received 21.05.2020  
Accepted 04.07.2020

# АДЕНОЗИН-РЕГУЛИРУЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВЕНТИЛЯЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

М.Е. Дьякова<sup>1</sup>, Н.Б. Серебряная<sup>2,3,4</sup>, Л.Д. Кирюхина<sup>1</sup>, Д.С. Эсмедляева<sup>1</sup>,  
П.К. Яблонский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Раскрытие участия пуринергической системы в патогенезе вентиляционных нарушений может дать дополнительную информацию о патофизиологических механизмах воспаления и компенсации, приводящих к развитию вентиляционных нарушений при туберкулезе легких. Цель исследования — выявить связь параметров аденозинового метаболизма, воспалительного ответа с вентиляционными нарушениями у больных туберкулезом легких. *Материалы и методы.* В зависимости от типа вентиляционных нарушений (ВН) больные с туберкулезом легких (ТЛ) были разделены на группы: пациенты с обструктивным типом ВН, пациенты со смешанным типом ВН, а также больные ТЛ с отсутствием нарушений механики дыхания — без ВН. Пуриновый метаболизм оценивали по активности аденозиндезаминазы (АДА-1, -2) в сыворотке крови, мононуклеарах и нейтрофилах, концентрации экто-5'-нуклеотидазы (экто-5'-НК) и CD26 (дипептидилпептидазы-4, ДПП-4), окислительный взрыв фагоцитов — по тесту восстановления нитросинего тетразолия, генерацию оксида азота — по концентрации метаболитов NO. *Результаты.* У больных ТЛ выявлены разнонаправленные изменения активности и концентрации ферментов в сыворотке крови (снижение АДА-1 и CD26 (ДПП-4) при повышении АДА-2). Повышенная внутриклеточная концентрация аденозина определена у больных ТЛ без ВН в мононуклеарах, а у больных со смешанным и обструктивным типом ВН — в нейтрофилах. В мононуклеарах больных ТЛ без ВН и пациентов с обструктивным типом ВН регистрируется только снижение концентрации радикалов азота. Напротив, гиперактивация нейтрофилов зарегистрирована во всех группах. У больных ТЛ без ВН и у больных со смешанным типом ВН параметры внешнего дыхания связаны с активностью вне-/внутриклеточной АДА, тогда как обструктивные ВН обусловлены избыточным образованием аденозина в сыворотке крови, что обеспечивается концентрацией экто-5'-НТ и активностью АДА-2 в комплексе с CD26 (ДПП-4). Изменения функций внешнего дыхания у больных ТЛ связаны со снижением концентрации радикалов оксида азота в сыворотке крови, нарушением азот-зависимой бактерицидности фагоцитов, гиперпродукцией кислородных радикалов активированными нейтрофилами. *Заключение.* Представленные нами данные свидетельствуют о том, что пуринергическая регуляция вовлечена в регуляцию воспалительных и компенсаторных процессов у больных ТЛ и связана с нарушением эффективности вентиляции. Наиболее тяжелые нарушения дыхания, наблюдаемые в группе больных ТЛ со смешанным типом ВН, связаны с наиболее выраженными изменениями активностей ферментов нуклеотидаз, в частности экто-АДА-2 и ДПП-4/CD26.

**Ключевые слова:** пуринергическая система, аденозин, аденозиндезаминаза, туберкулез, вентиляционные нарушения, радикалы кислорода и азота.

## Адрес для переписки:

Дьякова Марина Евгеньевна  
194064, Россия, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2–4,  
ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский  
институт фтизиопульмонологии.  
Тел.: 8 921 375-54-32. E-mail: marinadyakova@yandex.ru

## Contacts:

Marina E. Dyakova  
194064, Russian Federation, St. Petersburg, Ligovskiy pr., 2–4,  
St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology.  
Phone: +7 921 375-54-32. E-mail: marinadyakova@yandex.ru

## Для цитирования:

Дьякова М.Е., Серебряная Н.Б., Кирюхина Л.Д., Эсмедляева Д.С.,  
Яблонский П.К. Аденозин-регулируемые механизмы в патогенезе  
вентиляционных нарушений у больных туберкулезом легких //  
Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 671–682. doi: 10.15789/2220-  
7619-ARM-1475

## Citation:

Dyakova M.E., Serebryanaya N.B., Kiryukhina L.D., Esmedlyeva D.S.,  
Yablonskiy P.K. Adenosine-regulated mechanisms in the pathogenesis  
of ventilation disorders in patients with pulmonary tuberculosis // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4,  
pp. 671–682. doi: 10.15789/2220-7619-ARM-1475

## ADENOSINE-REGULATED MECHANISMS IN THE PATHOGENESIS OF VENTILATION DISORDERS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Dyakova M.E.<sup>a</sup>, Serebryanaya N.B.<sup>b,c,d</sup>, Kiryukhina L.D.<sup>a</sup>, Esmedlyayeva D.S.<sup>a</sup>, Yablonskiy P.K.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Uncovering involvement of the purinergic system in the pathogenesis of ventilation disorders (VD) may provide additional information about the pathophysiological mechanisms leading to the development of VD in pulmonary tuberculosis (PT). The aim was to identify a relationship between the parameters of adenosine metabolism, inflammatory response and altered ventilation metabolism in PT patients. *Materials and methods.* Obstructive and mixed PT patients were assigned to subgroups with/without VD for assessing adenosine deaminase activity (ADA-1, 2) in serum, mononuclear cells, neutrophils; ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT); CD26 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4), phagocyte oxidative burst measured by NO generation. *Results.* PT patients showed decreased ADA-1 and CD26 (DPP-4), but increased ADA-2. Elevated intracellular adenosine concentration was found in mononuclear cells in patients lacking VD, whereas patients with mixed and obstructive VD — had it in neutrophils. Mononuclear cells of patients with PT lacking VD as well as with obstructive VD type had decreased NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration. Neutrophil hyperactivity was recorded in all groups of PT patients. Patients with PT lacking VD as well as with mixed VD type showed that the parameters of external respiration were associated with activity of extra-/intracellular ADA, whereas obstructive VD was caused by excessive formation of serum adenosine. Changes in respiratory function in PT were associated with decreased level of serum NO radicals, impaired nitrogen-dependent bactericidal phagocyte activity, and overproduced neutrophil oxygen radicals. *Conclusion.* Purinergic regulation is involved in regulating inflammatory and compensatory processes in PT patients as well as impaired ventilation efficiency. The most severe respiratory disorders observed in PT patients with mixed VD type are associated with the most prominent changes in nucleotidase activity, particularly ecto-ADA-2 and DPP-4/CD26.

**Key words:** purinergic system, adenosine, adenosinedeaminase, tuberculosis, ventilation disorders, oxygen and nitric oxide radicals.

### Введение

Туберкулез легких (ТЛ) — хроническое инфекционное заболевание, характеризующееся образованием гранулематозного поражения легких и выраженной воспалительной реакцией. В патогенезе воспалительного процесса как при туберкулезе, так и при других различных заболеваниях важную роль играет пуринергическая система. К пуринергической системе относят пуринергические рецепторы (типы P1 и P2), сигнальные молекулы, образующиеся при метаболизме пуринов (от АТФ через АДФ и АМФ до аденозина, лишённого фосфатных групп), а также ферменты-нуклеотидазы, необходимые для образования этих медиаторов. Во время клеточного стресса (воспаление, гипоксия, апоптоз и т. п.) из активированных клеток происходит выход АТФ и других нуклеотидов, которые обеспечивают синхронизацию клеточных ответов преимущественно на тканевом и органном уровне [11, 12, 20]. Внеклеточный АТФ играет важную роль при легочном воспалении, регулируя как функции иммунных клеток, так и резистентность к повреждающему действию тканевых структур. АТФ позитивно регулирует хемотаксис, продукцию фагоцитирующими клетками активных форм кислорода и азота — специфических регуляторов внутриклеточных реакций, лежащих в основе процессов воспаления, фиброобразования и регуляции сосудистого тонуса [12, 15]. Способствуя привлечению в ды-

хательные пути нейтрофилов и макрофагов, АТФ также может регулировать развитие хронического воспаления дыхательных путей [25]. Внеклеточный АТФ, связываясь с пуринергическими рецепторами 2 типа (P2), инициирует сигнальные каскады для индуцирования воспалительной реакции [17]. В свою очередь аденозин модулирует объем, продолжительность и разрешение воспалительной реакции, действуя через представленные в тканях четыре подтипа специфических P1-рецепторов — A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> и A<sub>3</sub>, регулирующих внутриклеточный уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [6, 12, 14].

Аденозин образуется при расщеплении нуклеотидов активированными эктонуклеотидазами: внеклеточный АТФ/АДФ расщепляют эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза (NTPDases, CD39) и экто-5'-нуклеотидаза (CD73), а внутриклеточный, путем дефосфорилирования АМФ, — 5'-нуклеотидазы. Биологическая доступность внутри- и внеклеточного аденозина регулируется двумя изоферментами аденозиндеаминазы (АДА) — АДА-1 и АДА-2, расщепляющими аденозин до инозина [6, 10, 32]. АДА-1 является преимущественно внутриклеточным ферментом, а АДА-2 выделяется антиген-презентирующими клетками при их взаимодействии с Т-лимфоцитами. Функциональная активность АДА зависит от образования комплексов с белками и углеводами на мембране клеток (АДА-1 — с ферментом дипептидилпептидазой-4

(ДПП4)/CD26, а АДА-2 — с гепарансульфатпротогликаном) и их ассоциации с аденозиновыми рецепторами [13, 21].

Имеются убедительные данные, указывающие на важную роль ферментов пуринового метаболизма в патогенезе хронических заболеваний легких, таких как бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких [9, 26, 27]. Ранее мы показали, что у больных фиброзно-кавернозной и инфильтративной формой ТЛ показатели пуринового метаболизма (активность АДА-1, экспрессия CD26) связаны со степенью активности, давности специфического поражения, наличия фиброзных изменений, ограничивающих казеозные участки [2]. Также нами показано, что у больных ТЛ нарушение функции внешнего дыхания связано с избыточным образованием аденозина при чрезмерной активации формирующих его ферментов, тогда как при сочетании ТЛ и ХОБЛ ведущим является нарушение деградации аденозина, обусловленное снижением активности АДА-1 [3]. Однако нет данных о роли ферментов пуринового метаболизма в патогенезе вентиляционных нарушений (ВН), характерных для больных туберкулезом легких, что и определяет актуальность данной работы.

У больных ТЛ встречаются все типы дыхательной недостаточности — обструктивный, рестриктивный и смешанный. В их основе лежит инфекционно-воспалительное повреждение бронхов и легких. При обструктивном типе нарушения обусловлены отеком-воспалительными и склеротическими изменениями стенок бронхов с сужением их просвета и явлениями бронхоспазма, фиброза интерстиция и межальвеолярных перегородок, скоплением в просвете бронхов патологического содержимого. Рестриктивный тип обусловлен инфильтрацией и деструкцией легочной ткани, пневмосклерозом, плевральными сращениями, удалением доли или долей легких. Смешанный тип развивается при сочетании различных механизмов дыхательных расстройств.

Цель настоящего исследования — выявить связь параметров аденозинового метаболизма, воспалительного ответа (окислительный взрыв, генерация оксида азота) с вентиляционно-газообменными нарушениями у больных туберкулезом легких.

## Материалы и методы

Ретроспективно было обследовано 60 больных с верифицированным диагнозом «туберкулез легких» (ТЛ), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии. Больные ТЛ были поделены на группы в зависимости от типа вентиляцион-

ных нарушений (ВН). Пациенты с обструктивным типом ВН ( $n = 26$ ) образовали II группу, больные со смешанным типом ВН ( $n = 11$ ) составили III группу. 23 больных ТЛ с отсутствием нарушений механики дыхания составили I группу, «без ВН». Характеристика больных представлена в табл. 1.

Обследование пациентов проводили до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии. В референтную группу были включены 30 практически здоровых доноров.

Пуриновый метаболизм оценивали по активности аденозиндезаминазы (АДА-1 и АДА-2) в сыворотке крови (экто-АДА), мононуклеарах (мн) и нейтрофилах (нф), определяемой методом G. Giusti (1974) на спектрофотометре PV1251C (Беларусь). Принцип метода заключается в том, что аммиак, высвобождаемый при трансформации (дезаминировании) аденозина в инозин, образует с щелочным раствором гипохлорита натрия и фенолом голубой индофенол, концентрация которого полностью пропорциональна концентрации аммиака и отражает активность АДА. Концентрацию экто-5'-нуклеотидазы (экто-5'-НК) в сыворотке крови, CD26 (ДПП-4) в сыворотке (растворимая форма, р) и мононуклеарах определяли методом ELISA (EctoNT5E, USCN, Китай, и HumansCD26 PlatinumEISA, eBioscience, Австрия), согласно протоколу производителя, на автоматическом фотометре для микропланшетов серии ELx808 производства BioTek Instruments Inc. (США).

Окислительный взрыв фагоцитов оценивали по тесту восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тесту) — спонтанному (НСТс) и индуцированному зимозаном (НСТи).

О генерации оксида азота судили по концентрации его метаболитов: нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) и нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ) в сыворотке крови, мононуклеарах и нейтрофилах, определяемых методом ELISA (R&D Systems, Канада), согласно протоколу производителя, на автоматическом фотометре для микропланшетов серии ELx808 производства BioTek Instruments Inc. (США).

Мононуклеары и нейтрофилы выделяли из периферической крови в градиенте плотности (1,077) фикола-верографина.

Оценка функции внешнего дыхания (ФВД) методом спирометрии, бодиплетизмографии и исследования диффузионной способности легких по угарному газу (ДСЛ) проводилась на комплексной установке экспертной диагностики ФВД MasterScreen Body Diffusion (Viasys Healthcare, Германия) в соответствии с критериями корректности выполнения легочных функциональных тестов, предложенных экспертами Европейского респираторного общества (ERS)/Американского торакального общества (ATS) [22, 24, 30].

Таблица 1. Характеристика больных туберкулезом легких

Table 1. Characteristics of patients with pulmonary tuberculosis

Признаки Signs	Тип вентиляционных нарушений Type of ventilation disorders			p-уровень различий между группами p-level, intergroup differences	
	без ВН (I группа) without VD (I group)	обструктивный (II группа) obstructive (II group)	смешанный (III группа) mixed (III group)		
Возраст, лет Age, years	30,0 (25,0–41,0)	31,0 (27,0–39,0)	31,0 (28,5–40,0)	1–2	0,61
				1–3	0,88
				2–3	0,64
Пол, муж./жен., % Gender, male/female, %	52,0/48,0	60,6/39,4	61,0/39,0	1–2	0,68
				1–3	0,41
				2–3	0,74
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	21,8 (20,7–23,9)	20,98 (19,3–24,0)	19,2 (17,7–20,8)	1–2	0,37
				1–3	<b>0,001</b>
				2–3	<b>0,057</b>
Количество курящих человек, % Number of smokers, %	12 (52,2)	12 (48,0)	6 (50,0)	1–2	0,71
				1–3	0,59
				2–3	0,89
Клиническая форма ТЛ, % PT clinical form, %				1–2	0,27
– инфильтративный ТЛ – infiltrative PT	30,4	24,0	16,7	1–3	0,89
– фиброзно-кавернозный ТЛ – fibro-cavernous PT	69,6	76,0	83,3	2–3	0,22
Длительность лечения, % Duration of treatment, %				1–2	0,36
				1–3	<b>0,003</b>
– до года – until the year	53,9	37,9	0	2–3	<b>0,006</b>
– 1–5 лет – 1–5 years	38,5	51,8	57,0		
– 5–10 лет – 5–10 years	3,8	10,30	21,5		
– более 10 лет – more than 10 years	3,8		21,5		
Выявление <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , % Detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , %	61,5	68,0	78,5	1–2	0,24
				1–3	0,56
				2–3	0,48
Лекарственно-устойчивые <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , % Drug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , %	78,6	94,1	100	1–2	0,24
				1–3	0,23
				2–3	0,77
ОЕЛ, % должного TLC, % normal	107,4 (99,4–113,3)	103,9 (95,9–108,9)	77,8 (73,0–86,3)	1–2	0,23
				1–3	<b>0,0000</b>
				2–3	<b>0,0000</b>
ЖЕЛ, % должного VC, % normal	103,3 (89,2–111,0)	89,8 (81,5–101,0)	64,4 (55,6–67,5)	1–2	<b>0,01</b>
				1–3	<b>0,0000</b>
				2–3	<b>0,0000</b>
ФЖЕЛ, % должного FVC, % normal	100,1 (89,8–111,8)	89,9 (80,3–98,8)	59,7 (54,2–66,4)	1–2	<b>0,004</b>
				1–3	<b>0,0000</b>
				2–3	<b>0,0000</b>
ООЛ, % должного RV, % normal	122,7 (114,5–133,2)	136,9 (121,5–163,6)	125,9 (115,4–150,6)	1–2	<b>0,01</b>
				1–3	0,55
				2–3	0,21
ООЛ/ОЕЛ, % должного RV/TLC, % normal	109,3 (98,8–119,8)	119,4 (112,0–146,2)	160,0 (133,1–175,5)	1–2	<b>0,001</b>
				1–3	<b>0,0000</b>
				2–3	<b>0,04</b>
Евд IC	95,4 (84,4–111,0)	87,0 (77,2–98,6)	56,0 (50,1–62,8)	1–2	<b>0,06</b>
				1–3	<b>0,0000</b>
				2–3	<b>0,0000</b>

Признаки Signs	Тип вентиляционных нарушений Type of ventilation disorders			p-уровень различий между группами p-level, intergroup differences	
	без ВН (I группа) without VD (I group)	обструктивный (II группа) obstructive (II group)	смешанный (III группа) mixed (III group)		
Ровыд ERV	107,7 (92,6–126,8)	83,7 (68,9–96,6)	80,1 (62,9–96,2)	1–2	<b>0,007</b>
				1–3	<b>0,003</b>
				2–3	0,63
ОФВ1, % должного FEV1, % normal	99,2 (92,1–109,1)	80,3 (72,8–84,8)	52,0 (47,8–60,9)	1–2	<b>0,0000</b>
				1–3	<b>0,0000</b>
				2–3	<b>0,0000</b>
ОФВ1/ФЖЕЛ, % FEV1/FVC, %	82,7 (78,6–87,6)	72,0 (67,4–75,9)	78,9 (70,6–82,9)	1–2	<b>0,0000</b>
				1–3	<b>0,028</b>
				2–3	0,09
ДСЛ, % должного DLCO, % normal	72,6 (64,4–80,8)	62,8 (57,3–72,5)	46,6 (38,1–51,9)	1–2	<b>0,01</b>
				1–3	<b>0,0000</b>
				2–3	<b>0,0000</b>
ДСЛ/АО, % должного DLCO/VA	77,6 (69,5–84,1)	75,4 (67,9–82,6)	69,9 (63,9–76,6)	1–2	0,59
				1–3	0,1
				2–3	0,3

Примечания. ОЕЛ — общая емкость легких; ЖЕЛ — жизненная емкость легких; ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких; ООЛ — остаточный объем легких; Евд — емкость вдоха; Ровыд — резервный объем выдоха; ОФВ1 — объем форсированного выдоха за 1 с; ОФВ1/ФЖЕЛ — индекс Генслера; ДСЛ — диффузионная способность легких; ДСЛ/АО — трансфер-коэффициент; p — статистическая значимость межгрупповых различий. Данные приведены в виде медианы и межквартильного размаха.

Notes. TLC — total lung capacity; VC — vital lung capacity; FVC — forced vital lung capacity; RV — residual lung volume; IC — inspiratory capacity; ERV — reserve expiratory volume; FEV1 — forced expiratory volume in the first second; FEV1/FVC — Gensler index; DLCO — carbon monoxide diffusing capacity; DLCO/VA — transfer coefficient; p — statistical significance of intergroup differences. Data are presented as median and interquartile interval.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 10. В случае отклонения от нормального распределения (критерий Шапиро–Уилка) рассчитывали медиану (Me), первый и третий квартили ( $Q_1$ – $Q_3$ ). Оценивали достоверность различий метрических величин по критерию Уилкоксона. При корреляционном анализе метрических величин использовали ранговый коэффициент Спирмена.

## Результаты

У больных туберкулезом легких, по сравнению с референтной группой, отмечено увеличение концентрации экто-5'-НК, активности экто-АДА-2 при снижении концентрации CD26 (ДПП-4) мононуклеарами (табл. 2). Значимое снижение активности экто-АДА-1 у больных группы «без ВН» сопровождалось снижением внутриклеточной активности АДА-1 в мононуклеарах, а у больных с обструктивным типом вентиляционных нарушений — снижением активности АДА-1 в нейтрофилах. У больных со смешанным типом ВН отмечено снижение активности АДА-1 в нейтрофилах ( $p = 0,03$ ) и концентрации растворимой формы CD26 (ДПП-4) ( $p = 0,056$ ).

Активность экто-АДА-2 у больных со смешанным типом ВН значимо выше, чем в группе «без ВН» (в 1,3 раза,  $p = 0,03$ ) и с обструктивным типом ВН (в 1,6 раза,  $p = 0,005$ ).

Представленные в табл. 2 данные позволяют считать, что уровень внеклеточного аденозина у больных ТЛ, независимо от отсутствия/наличия вентиляционных нарушений, повышен (судя по концентрации экто-5'-НК — ключевого фермента, регулирующего концентрацию внеклеточного аденозина). При этом активность ферментов, дезаминирующих аденозин, у обследованных больных различна.

Наибольшая активность экто-АДА-2, ответственного за необратимое дезаминирование внеклеточного аденозина, отмечается у больных ТЛ со смешанным типом ВН. Активность АДА-1, дезаминирующего, главным образом, внутриклеточный аденозин в комплексе с CD26 (ДПП-4), напротив, снижена в группе «без ВН» в сыворотке и в мононуклеарах, в группе с обструктивным типом ВН — в сыворотке и в нейтрофилах, а у больных со смешанным типом ВН — только в нейтрофилах. Таким образом, у больных ТЛ выявлены разнонаправленные изменения активности и концентрации ферментов (снижение АДА-1 и CD26 (ДПП-4) при повышении экто-АДА-2), что не позволяет сделать однозначных выводов о возможном повышении или снижении концентрации аденозина в сыворотке крови. Однако условия для повышения внутриклеточной концентрации аденозина определены в мононуклеарах у больных ТЛ без ВН, а у больных со смешанным и обструктивным типом ВН — в нейтрофилах. То есть у больных ТЛ с разными типами

ВН условия для повышения уровня аденозина создаются в воспалительных клетках различных типов.

Результаты корреляционного анализа (только значимые корреляции) ферментов пуринового метаболизма и параметров ФВД представлены в табл. 3.

Полученные корреляции иллюстрируют определенные особенности, отмеченные у больных ТЛ в следующих группах:

- «без ВН»: параметры, характеризующие легочные объемы (ОЕЛ, ФЖЕЛ, РОвыд) и один из параметров, характеризующих проходимость дыхательных путей (индекс Генслера), ассоциированы с активностью экто-АДА-2 в сыворотке крови;
- с обструктивным типом ВН: параметры, характеризующие легочные объемы

(ОЕЛ, ЖЕЛ и отношение ООЛ/ОЕЛ), связаны с уровнем экто-5'-НТ и пептидазы CD26 (ДПП-4) в сыворотке крови;

– со смешанным типом ВН: характеристика легочных объемов (Евд и РОвыд) взаимосвязана с активностью экто-АДА-2 в сыворотке крови и АДА-1 нейтрофилов.

Таким образом, можно предположить, что у больных ТЛ без ВН и у больных со смешанным типом ВН параметры внешнего дыхания связаны с активностью вне-/внутриклеточной АДА, метаболизирующей аденозин до инозина (как следствие — удаление избыточного аденозина из крови и воспалительных клеток), тогда как обструктивные ВН обусловлены, по видимому, избыточным образованием аденозина в сыворотке крови, что обеспечивается концентрацией экто-5'-НТ и активностью АДА-2

**Таблица 2. Показатели пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких в исследуемых группах**  
Table 2. Indicators of purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis in the study groups

Признаки Signs	РГ RG	Тип вентиляционных нарушений Type of ventilation disorders			p-уровень различий между группами p-level, intergroup differences	
		без ВН (I группа) without VD (I group)	обструктивный (II группа) obstructive (II group)	смешанный (III группа) mixed (III group)		
<b>Сыворотка</b> Serum						
экто-АДА-1, ед/л ecto-ADA-1, U/l	3,3 (2,2–4,15)	2,6*(p=0,018) (1,7–3,2)	2,3*(p=0,019) (1,4–3,1)	3,3 (1,7–6,5)	1–2	0,74
					1–3	0,14
					2–3	0,09
экто-АДА-2, ед/л ecto-ADA-2, U/l	11,2 (9,6–12,1)	14,8*(p=0,00005) (11,4–18,5)	12,0*(p=0,002) (10,4–17,0)	19,0*(p=0,0000000) (14,5–29,9)	1–2	0,22
					1–3	0,03
					2–3	0,005
экто-5'-НК, нг/мл ecto-5'-NK, ng/ml	0,06 (0,01–0,6)	1,1*(p=0,002) (0,58–2,1)	0,78*(p=0,002) (0,4–1,0)	0,75*(p=0,003) (0,67–1,4)	1–2	0,15
					1–3	0,83
					2–3	0,69
CD26 (ДПП-4)р, нг/мл CD26 (DPP-4)s, ng/ml	692,5 (625,0–875,0)	540,8 (452,9–700,0)	550,0 (432,4–585,0)	473,5*(p=0,056) (200,0–560,0)	1–2	0,97
					1–3	0,33
					2–3	0,39
<b>Мононуклеары</b> Mononuclear cells						
АДА-1, ед/10 <sup>6</sup> клеток ADA-1, U/10 <sup>6</sup> cells	1,95 (1,07–3,0)	1,03*(p=0,003) (0,54–2,2)	1,45 (0,58–2,2)	1,2 (0,65–2,3)	1–2	0,84
					1–3	0,79
					2–3	1,0
АДА-2, ед/10 <sup>6</sup> клеток ADA-2, U/10 <sup>6</sup> cells	0,75 (0–1,24)	0,55 (0–1,05)	0,58 (0–0,85)	0,95 (0,38–1,4)	1–2	0,95
					1–3	0,24
					2–3	0,21
CD26 (ДПП-4), нг/10 <sup>6</sup> клеток CD26 (DPP-IV), ng/10 <sup>6</sup> cells	19,2 (12,8–25,0)	0,93*(p=0,002) (0,67–1,92)	3,8*(p=0,002) (1,2–5,5)	2,2*(p=0,018) (1,5–4,5)	1–2	0,15
					1–3	0,26
					2–3	0,66
<b>Нейтрофилы</b> Neutrophils						
АДА-1, ед/10 <sup>6</sup> клеток ADA-1, U/10 <sup>6</sup> cells	1,46 (0,85–1,85)	1,28 (0,43–1,9)	1,2*(p=0,005) (0,63–1,49)	0,65*(p=0,003) (0,5–2,6)	1–2	0,80
					1–3	0,79
					2–3	0,57

**Примечание.** \* — отличия значимы по сравнению с референсной группой (РГ).

Note. \* — significant differences compared to reference group (RG).

в комплексе с CD26 (ДПП-4). Корреляционные закономерности также совпадают с отмеченными ранее (по данным табл. 2) преимущественными нарушениями метаболизма аденозина в нейтрофилах больных ТЛ со смешанным типом ВН.

Важными защитными механизмами в условиях инфекционного процесса являются кислород- и азот-зависимая бактерицидность фагоцитов. Однако в условиях хронического воспаления развивается гиперпродукция окислительных радикалов, что приводит к окислительному стрессу и тканевому повреждению. У больных ТЛ концентрация метаболита NO (нитратного радикала) в сыворотке крови снижена во всех изученных группах (табл. 4).

Оценка функционального состояния фагоцитов (по уровням метаболитов NO и активности окислительного взрыва в НСТ-тесте) свидетельствует, что наиболее выраженные метаболические нарушения имеют мононуклеары больных ТЛ со смешанным типом ВН (гиперпродукция кислородных радикалов при активации, по данным стимулированного НСТ-теста, и угнетение продукции азотных радикалов — по уровню  $\text{NO}_2^-$ ). В мононуклеарах больных ТЛ без ВН и с обструктивным типом ВН изменения менее выраженные: регистрируется только снижение концентрации радикалов азота (по уровню  $\text{NO}_3^-$ ). Напротив, гиперактивация нейтрофилов зарегистрирована во всех группах больных ТЛ, что также проявляется в их гиперактивности, по данным стимулированного НСТ-теста, и существенном угнетении продукции азотных радикалов (по уровню  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ ).

Корреляционный анализ выявил определенные взаимосвязи (табл. 5) показателей у больных ТЛ в разных группах:

- в группе «без ВН» параметры внешнего дыхания, характеризующие статические легочные объемы (ОЕЛ, ЖЕЛ, РОВыд, ООЛ) и динамические легочные объемы, а также проходимость дыхательных путей (ФЖЕЛ, ОФВ1), положительно связаны с генерацией метаболитов NO мононуклеарами и параметрами окислительного взрыва нейтрофилов; параметры, характеризующие легочный газообмен, — с сывороточной продукцией нитрита;

- в группе с обструктивным типом ВН ЖЕЛ (один из параметров, характеризующих легочные объемы), ОФВ1 и индекс Генслера (характеризующие проходимость дыхательных путей) зависели от уровней спонтанного окислительного взрыва мононуклеаров и нейтрофилов (спонтанной продукции кислородных радикалов), а также продукции нитрита нейтрофилами. В целом в этой группе больных выявлено минимальное количество значимых корреляций;

- в группе со смешанным типом ВН легочные объемы (ООЛ, ЖЕЛ, отношение ООЛ/ОЕЛ, Евд) и параметры, характеризующие проходимость дыхательных путей (ФЖЕЛ, ОФВ1, ОФВ1/ФЖЕЛ), связаны со спонтанным окислительным взрывом мононуклеаров, со сниженной концентрацией нитрата как в сыворотке, так и мононуклеарах и нейтрофилах.

Таким образом, выявленные корреляции подтверждают, что изменения функции внешнего дыхания у больных ТЛ связаны со сни-

**Таблица 3. Корреляционные связи между активностью ферментов пуринового метаболизма и показателями внешнего дыхания (коэффициент корреляции и его значимость)**

Table 3. Correlations between the activity of purine metabolism enzymes and indicators of external respiration (correlation coefficient and its significance)

Пары признаков Pairs of signs		Тип вентиляционных нарушений Type of ventilation disorders		
		без ВН (I группа) without VD (I group)	обструктивный (II группа) obstructive (II group)	смешанный (III группа) mixed (III group)
экто-АДА-2 ecto-ADA-2	РОВыд   ERV	0,6 (0,002)	-	0,68 (0,03)
	ОФВ1/ФЖЕЛ   FEV1/FVC	-0,51 (0,01)	-	-
	ФЖЕЛ   FVC	0,46 (0,027)	-	-
	Евд   IC	-	-	-0,6 (0,038)
	ОЕЛ   TLC	0,52 (0,01)	-	-
АДА-1нф ADA-1nph	Евд   IC	-	-	0,66 (0,0065)
экто-5'-НТ ecto-5'-NT	ОЕЛ   TLC	-	-0,68 (0,008)	-
CD26 (ДПП-4)	ООЛ% ОЕЛ   RV% TLC	-	-0,67 (0,01)	-
CD26 (DPP-4)	ЖЕЛ   VC	-	0,63 (0,02)	-

жением концентрации радикалов оксида азота в сыворотке крови, нарушением азот-зависимой бактерицидности фагоцитов (в значительной степени определяемой факторами патогенности *Mycobacterium tuberculosis*), гиперпродукцией кислородных радикалов активированными нейтрофилами, причем степень выраженности и комбинация этих нарушений различны в группах больных с выделенными нами типами ВН.

## Обсуждение

В последние годы пуриnergическая система определяется как важный регулятор тканевой интеграции в гомеостатических условиях и при патологии (воспалении, опухолевом росте и метастазировании, аутоиммунных заболеваниях и т. д.). Особенности пуриnergической регуляции при туберкулезном процессе, морфологической основой которого является воспаление,

**Таблица 4. Показатели метаболитов оксида азота, окислительного взрыва в исследуемых группах**  
Table 4. Parameters of nitric oxide metabolites and oxidative burst in the study groups

Признаки Signs	РГ RG	Тип вентиляционных нарушений Type of ventilation disorders			p-уровень различий между группами p-level, intergroup differences	
		без ВН (I группа) without VD (I group)	обструктивный (II группа) obstructive (II group)	смешанный (III группа) mixed (III group)		
<b>Сыворотка</b> Serum						
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, мкмоль/л</b> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , μmol/l	32,5 (20,0–50,0)	20,0 (6,6–37,4)	10,3 (5,6–24,9)	19,8 (5,3–50,0)	1–2	0,46
					1–3	0,88
					2–3	0,5
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, мкмоль/л</b> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , μmol/l	40,0 (40,0–55,0)	11,2*(p=0,0009) (5,7–22,3)	13,7*(p=0,00003) (5,8–19,3)	10,6*(p=0,0004) (4,8–25,2)	1–2	0,89
					1–3	0,97
					2–3	0,99
<b>Мононуклеары</b> Mononuclear cells						
<b>НСТс, ед. ОП/10<sup>6</sup> клеток</b> NBTs units of optical density/10 <sup>6</sup> cells	139,7 (117,5–195,3)	91,0 (73,5–180,7)	105,5 (79,7–165,9)	145,9 (131,5–163,6)	1–2	0,82
					1–3	0,4
					2–3	0,28
<b>НСТИ, ед. ОП/10<sup>6</sup> клеток</b> NBTi units of optical density/10 <sup>6</sup> cells	271,6 (204,7–317,2)	225,9 (169,0–510,5)	293,4 (200,0–428,0)	399,4*(p=0,04) (266,7–568,5)	1–2	0,56
					1–3	0,2
					2–3	0,3
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, нг/10<sup>6</sup> клеток</b> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , ng/10 <sup>6</sup> cells	0,015 (0,014–0,020)	0,004*(p=0,0005) (0,002–0,0065)	0,0034*(p=0,0008) (0,0025–0,005)	0,0052*(p=0,04) (0,0036–0,013)	1–2	0,79
					1–3	0,34
					2–3	0,19
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, нг/10<sup>6</sup> клеток</b> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ng/10 <sup>6</sup> cells	0,023 (0,013–0,025)	0,007*(p=0,0005) (0,0044–0,011)	0,0075*(p=0,001) (0,003–0,015)	0,0088 (0,0056–0,016)	1–2	0,94
					1–3	0,43
					2–3	0,64
<b>Нейтрофилы</b> Neutrophils						
<b>НСТс, ед. ОП/10<sup>6</sup> клеток</b> NBTs units of optical density/10 <sup>6</sup> cells	108,7 (90,9–129,4)	188,4*(p=0,065) (91,5–240,8)	147,0 (84,4–200,3)	167,2 (91,0–191,0)	1–2	0,45
					1–3	0,29
					2–3	0,62
<b>НСТИ, ед. ОП/10<sup>6</sup> клеток</b> NBTi units of optical density/10 <sup>6</sup> cells	200,5 (155,6–258,8)	367,3*(p=0,002) (213,0–568,3)	276,0*(p=0,001) (229,3–419,7)	289,7*(p=0,02) (219,8–393,0)	1–2	0,75
					1–3	0,63
					2–3	0,62
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, нг/10<sup>6</sup> клеток</b> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , ng/10 <sup>6</sup> cells	0,048 (0,038–0,065)	0,0025*(p=0,001) (0,002–0,007)	0,002*(p=0,0004) (0,0015–0,004)	0,0036*(p=0,001) (0,003–0,005)	1–2	0,78
					1–3	0,39
					2–3	0,27
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, нг/10<sup>6</sup> клеток</b> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ng/10 <sup>6</sup> cells	0,032 (0,024–0,042)	0,005*(p=0,001) (0,0004–0,006)	0,0049*(p=0,0002) (0,002–0,008)	0,013*(p=0,005) (0,007–0,015)	1–2	0,78
					1–3	0,06
					2–3	0,06

**Примечание.** \* — отличия значимы по сравнению с референсной группой (РГ).

Note. \* — significant differences compared to reference group (RG).

характеризующееся формированием гранулем с участием эпителиодных и гигантских клеток типа Пирогова–Ланганса с возможным развитием казеозного некроза, мало изучены. Основную группу больных в нашем исследовании составляют больные фиброзно-кавернозным ТЛ (табл. 1), для которого характерно наличие в ткани легких, наряду с очагами бронхо-легочного инфицирования, фиброзных изменений в области каверн и окружающей легочной ткани [1].

Поскольку пуринергические медиаторы — короткоживущие молекулы, об их продукции косвенно свидетельствует активность ключевых ферментов пуринового метаболизма: изоферментов аденозиндезаминазы, дипептидилпептидазы IV (CD26) и экто-5'-нуклеотидазы (CD73). Аденозиндезаминаза и экто-5'-нуклеотидаза соответственно понижают и повышают уровень аденозина, а АДА в комплексе с ДПП-4/CD26 способна защищать клетки от избыточного действия внеклеточного аденозина. Рост актив-

ности экто-АДА-2 ассоциирован со снижением уровня внеклеточного аденозина и активацией высокоаффинного P1-рецептора  $A_{2A}$ , играющего решающую роль в подавлении воспаления [6, 29]. Известно, что при хроническом воспалении повышенный уровень аденозина, связывающегося с рецепторами подтипов  $A_{2A}$  и  $A_{2B}$ , может способствовать развитию фиброза [8, 18]. Мы ранее показали, что у больных ТЛ в сочетании с ХОБЛ угнетение АДА сопровождается ростом концентрации аденозина и повышением экспрессии рецепторов  $A_1/A_{2B}$ . Избыточная сигнализация через указанные рецепторы усиливает локальную воспалительную активность и ремоделирование, приводя к снижению показателей легочного газообмена и росту общей емкости легких [3]. Мы предположили, что при туберкулезе легких повышенные уровни аденозина также могут изменять характер воспалительного ответа, что может проявиться в том числе нарушениями механики дыхания и легочного газообмена.

**Таблица 5. Корреляционные связи между характеристиками окислительного взрыва, метаболитами оксида азота и параметрами внешнего дыхания (коэффициент корреляции и его значимость)**

Table 5. Correlations between the characteristics of the oxidative burst, nitric oxide metabolites and parameters of external respiration (correlation coefficient and its significance)

Пары признаков Pairs of signs		Тип вентиляционных нарушений Type of ventilation disorders		
		без ВН (I группа) without VD (I group)	обструктивный (II группа) obstructive (II group)	смешанный (III группа) mixed (III group)
$NO_2^-$ с $NO_3^-$ с	ДСЛ   DLCO	0,52 (0,0061)	-	-
$NO_2^-$ с $NO_3^-$ с	ДСЛ/АО   DLCO/VA	0,44 (0,02)	-	-
$NO_2^-$ с $NO_3^-$ с	ОФВ1/ФЖЕЛ   FEV1/FVS	-	-	-0,52 (0,046)
$NO_2^-$ мн $NO_3^-$ мн	Ровыд   ERV	0,57 (0,05)	-	-
	ОФВ1   FEV1	0,69 (0,01)	-	-
	ФЖЕЛ   FVS	0,69 (0,014)	-	-
	ЖЕЛ   VC	0,76 (0,004)	-	-
	ОЕЛ   TLC	0,62 (0,03)	-	-
	ДСЛ   DLCO	0,7 (0,01)	-	-
$NO_2^-$ мн $NO_3^-$ мн	ООЛ   RV	0,7 (0,009)	-	-0,83 (0,0009)
$NO_2^-$ мн $NO_3^-$ мн	ДСЛ/АО   DLCO/VA	-0,79 (0,002)	-	-
$NO_2^-$ нф $NO_3^-$ нф	ОФВ1   FEV1	-	-0,72 (0,03)	-
$NO_2^-$ нф $NO_3^-$ нф	ОФВ1   FEV1	-	-	-0,62 (0,04)
НСТ с.мн NBT s.mn	ОФВ1   FEV1	-	-	-0,63 (0,005)
	ЖЕЛ   VC	-	-0,48 (0,02)	-0,7 (0,0009)
	ФЖЕЛ   FVC	-	-	-0,6 (0,01)
	ООЛ%ОЕЛ   RV%TLC	-	-	0,53 (0,02)
НСТ с.нф NBT s.nph	Евд   IC	-	-	-0,53 (0,02)
	ОФВ1   FEV1	-0,57 (0,01)	-	-
	ОФВ1/ФЖЕЛ   FEV1/FVS	-	0,4 (0,05)	-
	ФЖЕЛ   FVC	-0,52 (0,02)	-	-
	ЖЕЛ   VC	-0,53 (0,02)	-	-
НСТ и.нф NBT i.nph	ОФВ1   FEV1	-0,59 (0,008)	-	-
	ФЖЕЛ   FVC	-0,55 (0,01)	-	-
	ЖЕЛ   VC	-0,47 (0,04)	-	-

Полученные нами данные свидетельствуют, что в группе «без ВН» умеренный рост уровня аденозина и сигнализация  $A_{2A}$ -рецептора, по-видимому, оказывают сдерживающее, противовоспалительное действие. В этой группе выявлена ассоциация активности экто-АДА-2 с общей емкостью легких. Показано, что ОЕЛ — один из вентиляционных параметров, который зависит от объема наиболее крупной полости, суммарного объема зон распада, поражения плевры и распространенности очагов отсева [4]. Это также согласуется с исследованиями Allen-Gipson D.S. и соавт. (2006), показавшими, что тканеспецифичные защитные эффекты  $A_{2A}$ -сигнализации обеспечивают стимуляцию репарации эпителиоцитов легких. Известно, что экто-АДА-2, экспрессируемый макрофагами, может служить маркером воспалительного ответа и тяжести туберкулезного процесса [31]. В нашем исследовании и тяжесть туберкулезного процесса отражает чрезмерный рост активности экто-АДА-2 у больных со смешанным типом ВН. В данной группе выявлена ассоциация активности экто-АДА-2 с емкостью вдоха. Показано, что емкость вдоха снижается при повышении объема пораженных участков легких [4].

В условиях хронического воспаления от степени снижения внутриклеточной активности АДА-1 зависит уровень аденозина и активации  $P_1$ -рецепторов, в частности высокоаффинного  $A_1$  и низкоаффинного  $A_{2B}$ . Установлено, что активация рецептора  $A_1$  способствует воспалению дыхательных путей и их обструкции [6]. Экспериментальные исследования показали, что рецептор  $A_{2B}$  в ассоциации с медиаторами, участвующими в ремоделировании бронхов, такими как ИЛ-6, матриксные металлопротеиназы и эндотелин-1, участвует в развитии легочной гипертензии, в увеличении воздушного пространства [18, 27]. Также показано, что рецептор  $A_{2B}$  способствует продукции нескольких провоспалительных медиаторов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-19 и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1), обеспечивающих хронизацию воспалительных процессов легких [6]. В нашем исследовании активность АДА-Инф ассоциирована с одним из параметров легочного объема — емкостью вдоха у больных со смешанным типом ВН.

Известно, что внеклеточный аденозин не только регулирует воспаление, но он также является и ключевым регулятором клеточного иммунитета. Если фермент экто-5'-нуклеотидаза (определяемая как CD73, обычно представленная на Treg) способствует образованию аденозина, который ингибирует пролиферацию Т-клеток, то другой фермент, ДПП-4/CD26, наоборот, активирует Т-лимфоциты, способствуя расщеплению аденозина. Растворимая форма CD26 имеет те же функции, что и мембранная

форма фермента. Разнонаправленность функций этих ферментов проявляется и у обследованных нами больных ТЛ с обструктивным типом ВН. В этой группе мы выявили явные разнонаправленные корреляции экто-5'-НТ и растворимой формой CD26 (ДПП-4) с параметрами, характеризующими легочные объемы. В исследованиях ряда авторов показано, что уровень растворимой формы CD26 (ДПП-4) при хронических заболеваниях отрицательно коррелирует с тяжестью заболевания, с выраженностью воспаления и распространенностью легочного фиброза [23, 26, 28]. В нашем исследовании у больных со смешанным типом ВН зарегистрирован сниженный уровень растворимой формы CD26 (ДПП-4), что согласуется со значимо более выраженной активностью АДА.

Известно, что аденозиновые рецепторы  $A_{2A}$  и  $A_{2B}$  задействованы в процессе регуляции сосудистого тонуса. Аденозин, действуя на эти рецепторы, определяет вазодилатацию, частично путем прямого действия на гладкомышечные клетки, частично через изменения метаболизма эндотелиальных клеток [14]. Комплексные метаболические изменения, выявленные нами у больных ТЛ со смешанным типом ВН (сниженные сывороточные уровни нитрита и нитрата), коррелируют с индексом Генслера, а у больных без нарушений ВН — с показателями легочного газообмена.

Регулируя активность иммунных клеток, аденозин по-разному изменяет продукцию реактивных радикалов кислорода и азота фагоцитами. Так, в результате связывания аденозина с высокоаффинным рецептором  $A_1$  нейтрофилов продукция активных радикалов кислорода повышается [19], а при связывании аденозина с рецепторами  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  и  $A_3$  на макрофагах продукция ими оксида азота угнетается [7]. В нашем исследовании у больных без нарушения ВН также прослеживается связь показателей функции внешнего дыхания со снижением продукции оксида азота и одновременным усилением окислительного взрыва нейтрофилов, однако у больных со смешанным типом ВН выявляется только изолированная взаимосвязь окислительного взрыва в мононуклеарах с показателями функции внешнего дыхания. Такую потерю взаимосвязей между функциональными параметрами мы расцениваем как дефект управления защитными реакциями в условиях утяжеления хронического инфекционного процесса.

## Заключение

Представленные нами данные свидетельствуют, что пуринергическая регуляция вовлечена в регуляцию воспалительных и компенсаторных процессов у больных туберкулезом легких и связана с клиническим течением забо-

ления, в том числе нарушением эффективности вентиляции. Наиболее тяжелые нарушения дыхания, наблюдаемые в группе больных ТЛ со смешанным типом ВН, связаны с наиболее выраженными изменениями активностей ферментов нуклеотидаз, в частности экто-АДА-2 и CD26 (ДПП-4). Можно предположить, что сни-

жение чрезмерной активности экто-АДА-2, повышение внутриклеточной активности АДА-1, и применение агонистов/антагонистов аденозиновых рецепторов может оказаться полезным терапевтическим подходом при лечении ТЛ и других хронических воспалительных заболеваний легких.

## Список литературы/References

1. Ворончихин Т.А., Аветисян А.О., Васильев И.В., Кудряшов Г.Г., Яблонский П.К. Результаты комплексного лечения ограниченного фиброзно-кавернозного туберкулеза легких // Медицинский Альянс. 2018. № 3. С. 56–64. [Voronchihin T., Avetisyan A., Vasil'ev I., Kudryashov G., Yablonskiy P. Results of complex treatment of limited fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis. *Meditsinskiy alyans = Medical Alliance*, 2018, no. 3, pp. 56–64. (In Russ.)] doi: 10.36422/23076348-2020-8-1-6-13
2. Дьякова М.Е. Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016. Т. 60, № 3. С.36–42. [Dyakova M.E. Features purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological physiology and experimental therapy*, 2016, vol. 60, no. 3, pp. 36–42. (In Russ.)] doi: 10.25557/0031-2991.2016.03.36-41
3. Дьякова М.Е., Серебряная Н.Б., Кирюхина Л.Д., Эсмедляева Д.С., Яблонский П.К. Аденозин-ассоциированные механизмы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких у больных туберкулезом легких // Патогенез. 2019. Т. 17, № 3. С. 47–56. [Dyakova M.E., Serebryanaya N.B., Kiryukhina L.D., Esmedlyayeva D.S., Yablonskiy P.K. Adenosine-related mechanisms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease in patients with pulmonary tuberculosis. *Patogenez = Pathogenesis*, 2019, vol. 17, no. 3, pp. 47–56. (In Russ.)] doi: 10.25557/2310-0435.2019.03.47-56
4. Кирюхина Л.Д., Гаврилов П.В., Савин И.Б., Тамм О.А., Володич О.С., Павлова М.В., Арчакова Л.И., Зильбер Э.К., Яблонский П.К. Вентиляционная и газообменная функции легких у больных с локальными формами туберкулеза легких // Пульмонология. 2013. № 6. С. 65–67. [Kiryukhina L.D., Gavrilov P.V., Savin I.B., Tamm O.A., Volodich O.S., Pavlova M.V., Archakova L.I., Zilber E.K., Yablonskiy P.K. Ventilation and gas exchange in patients with local forms of pulmonary tuberculosis. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2013, no. 6, pp. 65–67. (In Russ.)] doi: 10.18093/0869-0189-2013-0-6-807-811
5. Allen-Gipson D.S., Wong J., Spurzem J.R., Sisson J.H., Wyatt T.A. Adenosine A2A receptors promote adenosine-stimulated wound healing in bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 2006, vol. 290, no. 5, pp. L849–L855. doi: 10.1152/ajplung.00373.2005
6. Antonioli L., Csóka B., Fornai M., Colucci R., Kókai E., Drandizzi C., Haskó G. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov. Today*, 2014, vol. 19, no. 80, pp. 1051–1068. doi: 10.1016/j.drudis.2014.02.010
7. Antonioli L., Fornai M., Blandizzi C., Pacher P., Haskó G. Adenosine signaling and the immune system: when a lot could be too much. *Immunol. Lett.*, 2019, vol. 205, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.imlet.2018.04.006
8. Cekic C., Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 177–192. doi: 10.1038/nri.2016.4
9. Chang X.Y., Yang Y., Jia X.Q., Wang Y., Peng L.N., Ai X.H., Jiang C.Y., Guo J.H., Wu T.T. Expression and clinical significance of serum dipeptidyl peptidase IV chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med. Sci.*, 2016, vol. 351, no. 3, pp. 244–252. doi: 10.1016/j.amjms.2015.12.011
10. Dou L., Chen T.-F., Cowan P.J. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. *Clin. Immunol.*, 2018, vol. 188, pp. 67–73. doi: 10.1016/j.clim.2017.12.006
11. Eltzschig H.K., Eckle T. Ischemia and reperfusion — from mechanism to translation. *Nat. Med.*, 2011, vol. 17, no.11, pp. 1391–401. doi: 10.1038/nm.250
12. Faas M.M., Sáez T., de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses? *Mol. Aspects Med.*, 2017, vol. 55, pp. 9–19. doi: 10.1016/j.mam.2017.01.002
13. Franco R., Pacheco R., Gatell J.M., Gallart T., Lluís C. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 27, pp. 495–509. doi: 10.1615/critrevimmunol.v27.i6.10
14. Fredholm B.B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death and Differ.*, 2007, vol. 14, pp. 1315–1323. doi: 10.1038/sj.cdd.4402132
15. Gamble E., Grootendorst D.C., Hattotuwa K., O'Shaughnessy T., Ram F.S., Qiu Y., Zhu J., Vignola A.M., Kroegel C., Morell F., Pavord I.D., Rabe K.F., Jeffery P.K., Barnes N.C. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur. Respir. J.*, 2007, vol. 30, no. 3, pp. 467–471. doi: 10.1183/09031936.00013006
16. Giusti G. Adenosine deaminase. In: *Methods of enzymatic analysis*. Volume 2. Ed. by H. Bergmeyer. New York: Academic Press, 1974. pp. 1092–1099.
17. Jacob F., Novo P., Bachert C., Crombruggen V. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal.*, 2013, vol. 9, no. 3, pp. 285–306. doi: 10.1007/s11302-013-9357-4
18. Karmouty-Quintana H., Xia Y., Blackburn M.R. Adenosine signaling during acute and chronic disease states. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2013, vol. 91, no. 2, pp. 173–181. doi: 10.1007/s00109-013-0997-1
19. Kälvegren H., Fridfeldt J., Bengtsson T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. *Eur. J. Cell Biol.*, 2010, vol. 89, no. 6, pp. 462–467. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.12.004

20. Lazarowski E.R. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*, 2012, vol. 8, no. 3, pp. 359–373. doi: 10.1007/s11302-012-9304-9
21. Linden J., Cekic C. Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2013, vol. 32, no. 9, pp. 2097–2103. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.226837
22. MacIntyre N., Crapo R.O., Viegi G., Johnson D.C., van der Grinten C.P., Brusasco V., Burgos F., Casaburi R., Coates A., Enright P., Gustafsson P., Hankinson J., Jensen R., McKay R., Miller M.R., Navajas D., Pedersen O.F., Pellegrino R., Wanger J. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur. Respir. J.*, 2005, vol. 26, no. 4, pp. 720–735. doi: 10.1183/09031936.05.00034905
23. Matsuno O., Miyazaki E., Nureki S., Ueno T., Ando M., Kumamoto T. Soluble CD26 is inversely associated with disease severity in patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Biomark. Insights.*, 2007, vol. 1, pp. 201–204. doi: 10.1177/11772190600100012
24. Miller M.R., Hankinson J., Brusasco V., Burgos F., Casaburi R., Coates A., Crapo R., Enright P., van der Grinten C.P., Gustafsson P., Jensen R., Johnson D.C., MacIntyre N., McKay R., Navajas D., Pedersen O.F., Pellegrino R., Viegi G., Wanger J. Standardisation of spirometry. *Eur. Respir. J.*, 2005, vol. 26, no. 2, pp. 319–338. doi: 10.1183/09031936.05.00034805
25. Pelleg A., Schulman E.S., Barnes P.J. Extracellular adenosine 5'-triphosphate in obstructive airway diseases. *Chest*, 2016, vol. 150, no. 4, pp. 908–915. doi: 10.1016/j.chest.2016.06.045
26. Somborac-Baćura A., Buljević S., Rumora L., Čulić O., Detel D., Pancirov D., Popović-Grle S., Varljen J., Čepelak I., Žanić-Grubišić T. Decreased soluble dipeptidyl peptidase IV activity as a potential serum biomarker for COPD. *Clin. Biochem.*, 2012, vol. 45, no. 15, pp. 1245–1250. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.04.023
27. Sun C.X., Zhong H., Mohsenin A., Chunn J.L., Molina J.G., Belardinelli L., Zeng D., Blackburn M.R. Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, no. 8, pp. 2173–2182. doi: 10.1172/JCI27303
28. Tamaki Z., Kubo M., Yazawa N., Mimura Y., Ashida R., Tomita M., Tada Y., Kawashima T., Tamaki K. Serum levels of soluble CD26 in patients with scleroderma. *J. Dermatol. Sci.*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 67–69. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.05.004
29. Thiel M., Chouker A., Ohta A., Jackson E., Caldwell C., Smith P., Lukashev D., Bittmann I., Sitkovsky M.V. Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *PLoS Biol.*, 2005, vol. 3, no. 6, pp. 1088–1100. doi: 10.1371/journal.pbio.0030174
30. Wanger J., Clausen J.L., Coates A., Pedersen O.F., Brusasco V., Burgos F., Casaburi R., Crapo R., Enright P., van der Grinten C.P., Gustafsson P., Hankinson J., Jensen R., Johnson D., MacIntyre N., McKay R., Miller M.R., Navajas D., Pellegrino R., Viegi G. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur. Respir. J.*, 2005, vol. 26, no. 3, pp. 511–522. doi: 10.1183/09031936.05.00035005
31. Zavialov A.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov A.V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, vol. 88, no. 2, pp. 279–290. doi: 10.1189/jlb.1109764
32. Zimmermann H., Zebisch M., Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*, 2012, vol. 8, no. 3, pp. 437–502. doi: 10.1007/s11302-012-9309-4

**Авторы:**

**Дьякова М.Е.**, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;  
**Серебряная Н.Б.**, д.м.н., профессор кафедры цитологии и гистологии биологического факультета ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Кирюхина Л.Д.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. отделением функциональной диагностики ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;  
**Эсмедляева Д.С.**, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия;  
**Яблонский П.К.**, д.м.н., профессор, директор ФГБНУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия; декан медицинского факультета ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Dyakova M.E.**, PhD (Biology), Senior Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthysiology, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Serebryanaya N.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Cytology and Histology, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Immunopathophysiology, Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Kiryukhina L.D.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Head of the Department of Functional Diagnostics, St. Petersburg Research Institute of Phthysiology, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Esmedyayeva D.S.**, PhD (Biology), Senior Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthysiology, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Yablonskiy P.K.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the St. Petersburg Research Institute of Phthysiology, St. Petersburg, Russian Federation; Dean of the Medical Faculty, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.04.2020  
 Отправлена на доработку 23.05.2020  
 Принята к печати 24.05.2020

Received 29.04.2020  
 Revision received 23.05.2020  
 Accepted 24.05.2020

# ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

О.Ю. Борисова<sup>1,2</sup>, Н.Т. Гадуа<sup>1</sup>, А.С. Пименова<sup>1</sup>, А.В. Чаплин<sup>1,2</sup>, И.А. Чагина<sup>1</sup>,  
Ю.Н. Урбан<sup>1</sup>, Н.М. Максимова<sup>1</sup>, М.П. Корженкова<sup>1</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>,  
Л.И. Кафарская<sup>2</sup>, М.С. Афанасьев<sup>3</sup>, В.В. Крикун<sup>4</sup>, О.Ю. Якунина<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

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

<sup>4</sup> БУХМАО — Югры Нижневартовская окружная клиническая детская больница, г. Нижневартовск, Россия

<sup>5</sup> ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Цель исследования — характеристика токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных на территории России в 2017–2019 гг. В исследование включено 12 токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в период с января 2017 г. по июнь 2019 г. Изучение штаммов *C. diphtheriae* проводили по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам. Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* осуществляли с помощью мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) и секвенирования гена *dtxR* с последующим проведением биоинформационного анализа. **Результаты.** Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* были выделены в Новосибирской, Самарской и Челябинской областях, Ханты-Мансийском автономном округе — Югре и Республике Северная Осетия — Алания. Среди изученных штаммов 5 штаммов были выделены от больных дифтерией (из которых только в одном случае была средне-тяжелая форма клинического течения и в остальных — легкая форма) и 7 штаммов — от бактерионосителей. У больных дифтерией в двух случаях идентифицированы штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST25, в одном случае — штамм биовара *gravis* ST8 и в двух случаях — штаммы биовара *mitis* ST67. У бактерионосителей токсигенных *C. diphtheriae* в двух случаях идентифицированы штаммы биовара *gravis* сиквенс-типа ST25 и в 4 случаях — штаммы биовара *mitis* ST67. В одном случае идентифицировать сиквенс-тип не удалось. Все выявленные сиквенс-типы широко распространены в мире и представлены большим количеством изолятов в базе данных PubMLST, а также характеризуются значительным количеством производных сиквенс-типов. При этом они входят в различные клональные комплексы и значительно отличаются друг от друга, что способствует их надежному различению в МЛСТ. Изучение особенностей структуры гена *dtxR* показало, что все выявленные аллельные варианты гена являются типичными для представителей этих сиквенс-типов, новых аллельных варианты гена *dtxR* у изученных штаммов не было обнаружено. Показано, что несинонимичная замена С440Т с заменой аминокислоты А147V встречается в пределах

## Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна  
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10,  
ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (906) 747-64-84 (служебн.), 8 (916) 147-19-60 (моб.).  
E-mail: olgborisova@mail.ru

## Contacts:

Olga Yu. Borisova  
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,  
Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.  
Phone: +7 (906) 747-64-84 (office), 8 (916) 147-19-60 (mobile).  
E-mail: olgborisova@mail.ru

## Для цитирования:

Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Чаплин А.В., Чагина И.А.,  
Урбан Ю.Н., Максимова Н.М., Корженкова М.П., Афанасьев С.С.,  
Кафарская Л.И., Афанасьев М.С., Крикун В.В., Якунина О.Ю.  
Характеристика токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*,  
выделенных на территории России // Инфекция и иммунитет. 2021.  
Т. 11, № 4. С. 683–691. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1272

## Citation:

Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Chaplin A.V., Chagina I.A.,  
Urban Y.N., Maksimova N.M., Korzhenkova M.P., Afanasiev S.S.,  
Kafarskaya L.I., Afanasiev M.S., Krikun V.V., Yakunina O.Yu. Characterization  
of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Russia //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet. 2021,  
vol. 11, no. 4, pp. 683–691. doi: 10.15789/2220-7619-COT-1272

только одного аллеля, характерного для представителей сиквенс-типов ST8, ST185, ST195 и ST451, что говорит о поздно произошедшей мутации. Полиморфизм C640A с заменой аминокислоты L214I присутствует не только в данном аллеле, но и в более базальных ветвях дерева, что свидетельствует об изолейцине как о предковом состоянии белка.

**Ключевые слова:** дифтерия, *C. diphtheriae*, токсигенные штаммы, больные, бактерионосители, мультилокусное сиквенс-типирование.

## CHARACTERIZATION OF TOXIGENIC *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* STRAINS ISOLATED IN RUSSIA

Borisova O.Yu.<sup>a,b</sup>, Gadua N.T.<sup>a</sup>, Pimenova A.S.<sup>a</sup>, Chaplin A.V.<sup>a,b</sup>, Chagina I.A.<sup>a</sup>, Urban Y.N.<sup>a</sup>, Maksimova N.M.<sup>a</sup>, Korzhenkova M.P.<sup>a</sup>, Afanasiev S.S.<sup>a</sup>, Kafarskaya L.I.<sup>b</sup>, Afanasiev M.S.<sup>c</sup>, Krikun V.V.<sup>d</sup>, Yakunina O.Yu.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Nizhnevartovsk District Clinical Children's Hospital, Nizhnevartovsk, Russian Federation

<sup>e</sup> Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to characterize toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* by examining 12 toxigenic strains of *C. diphtheriae* isolated in Russia between January, 2017 to June, 2019. The morphological, toxigenic and biochemical properties of *C. diphtheriae* was studied. Genotyping of *C. diphtheriae* strains was performed using MLST and *dtxR* gene sequencing with subsequent phylogenetic analysis. **Results.** Toxigenic strains of *C. diphtheriae* were isolated in the Novosibirsk, Samara and Chelyabinsk Regions, the Khanty-Mansi Autonomous Okrug — Yugra as well as the Republic of Northern Ossetia — Alania. Among these strains, 5 were isolated from diphtheria patients (moderate disease found in one case, mild course — remaining patients) and 7 strains were isolated from bacterial carriers. In two cases *C. diphtheriae* from diphtheria patients were identified as ST25 sequence type, *gravis* variant; in one case — ST8 type, *gravis* variant; two cases — ST67 sequence type, *mitis* variant. In asymptomatic carriers of tox-positive *C. diphtheriae* strains they belonged to ST25 sequence type, *gravis* variant — in two cases, ST67 type, *mitis* variant — in four cases. A sequencing type was not identified in one case. All sequence types were widespread globally being presented by a large number of isolates in the PubMLST and characterized by a substantial amount of derivative sequence types. At the same time, they belonged to different clonal complexes and differed markedly from each other contributing to their reliable difference as assessed by MLST. Study of gene *dtxR* sequence diversity showed that all allelic variants were typical for the representatives of these sequence types. New alleles of gene *dtxR* were not revealed in strains examined. It was shown that non-synonymous substitution C440T leading to A147V amino acid substitution was found solely in one allele distributed in ST8, ST185, ST195 and ST451 types suggesting at late mutation. In contrast, the polymorphism C640A resulting in the amino acid substitution L214I was found not only in the same allele, but also in the basal tree branches indicating that isoleucine was in the ancestral sequence of the protein.

**Key words:** diphtheria, *C. diphtheriae*, toxigenic strains, patients, carriers, MLST.

## Введение

Дифтерия — острая бактериальная инфекция, характеризующаяся развитием фибринозного воспаления в месте «входных ворот», явлениями общей интоксикации и специфическими признаками поражения сердечно-сосудистой, нервной и выделительной систем. Вызывается грамположительными бактериями *Corynebacterium diphtheriae*, продуцирующими дифтерийный токсин, и может сопровождаться высокой летальностью, которая обусловлена возникновением тяжелых осложнений. Источником инфекции является больной или носитель токсигенных коринебактерий. Передача возбудителя происходит, как правило, воздушно-капельным путем от человека к человеку [2, 3, 5].

Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, дифтерия по-прежнему является серьезной проблемой общественного здравоохранения и причиной детской смертности в странах с недостаточным уровнем охвата населения профилактическими прививками. По данным ВОЗ и CDC, в Индии, Индонезии, Пакистане, Иране, Непале, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике дифтерия по сей день остается эндемичным заболеванием, течение которого характеризуется многообразием клинических форм и различной локализацией [11, 18]. Также в течение последних пяти лет регистрируются локальные вспышки в Таиланде, Лаосе и странах Африки. Наряду с этим в странах Европы стали появляться сообщения о случаях заболевания дифтерией среди мигрантов и туристов, посетивших эндемичные по этой

инфекции территории [9, 17]. Согласно данным, опубликованным на сайте Регионального бюро ВОЗ для стран Америки, в Бразилии, Венесуэле, Гаити, Доминиканской Республике и Колумбии в 2015 г. был зафиксирован подъем заболеваемости дифтерией [16]. Наиболее тяжелое положение отмечается в Боливарианской Республике Венесуэле. В период с 2016 по 2018 г. на территории этой страны было зарегистрировано 2572 случаев заболеваний дифтерией (324 случаев в 2016 г., 1040 в 2017 г., 1208 в 2018 г.), 271 из которых закончился летальным исходом (17 случаев в 2016 г., 103 в 2017 г., 151 в 2018 г.). В соответствии с данными, опубликованными 15 августа 2019 г., в Венесуэле и сейчас продолжают регистрировать как новые случаи заболевания (384 случая), так и смертельные исходы (16 случаев).

В России широкую иммунизацию детей АКДС-вакциной против дифтерии начали проводить с 1959 г. Достигнутые результаты подтвердили значимость массовой специфической иммунопрофилактики среди населения для поддержания в стране санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции [3, 4, 5, 8].

В течение последних 40 лет в России были отмечены два периода усиления эпидемического процесса дифтерийной инфекции [3, 4, 5]. Так, с 1978 г. появились предвестники первого подъема заболеваемости, пик которого регистрировался в 1984 г. (показатель заболеваемости составил 0,9 на 100 тыс. населения, показатель смертности — 0,001 на 100 тыс. населения). Следует отметить тот факт, что начиная с 1980-х гг. происходило изменение структуры заболевших. Впервые подъем был обусловлен преимущественным заболеванием взрослых, в основном в возрасте 20–39 лет. С 1990 г. в России начался второй периодический подъем заболеваемости, пик которого пришелся на 1994 г. (показатель заболеваемости составил 26,8 на 100 тыс. населения, показатель смертности — 0,8 на 100 тыс. населения). Такой подъем был обусловлен рядом социальных факторов и недостатками в осуществлении профилактических мероприятий: во-первых, накоплением неиммунных лиц в результате низкого уровня охвата прививками детей раннего возраста и взрослых, в частности медицинских работников, во-вторых, миграционными процессами с территорий стран бывшего СССР, неблагополучных по заболеваемости дифтерией. Кроме того, ухудшению эпидситуации по дифтерии способствовал экономический кризис, который привел к ухудшению социальных условий жизни значительной части населения. За период с 1990 по 1996 гг. заболело 111 144 человека (35 928 детей, 15 776 подростков и 59 450 взрослых), умерло 3047 человек (729 де-

тей, 37 подростков и 2281 взрослый). В большинстве случаев (95%) умершие не были привиты от дифтерии [5].

В настоящее время в условиях поддержания высокого уровня привитости (95% и более) достигнута стабилизация заболеваемости [3, 4, 8]. Согласно данным государственной статистической отчетности, в период с 2001 по 2018 г. показатель заболеваемости снизился с 0,63 до 0,003 случаев на 100 тыс. населения. В течение последних пяти лет выявляются единичные случаи бактерионосительства, не регистрируются вторичные случаи в очагах и летальные исходы [4, 8]. В структуре клинических форм преобладают легкие локализованные формы дифтерии [2, 4, 8].

Однако актуальность проблемы дифтерийной инфекции в условиях единичных случаев заболевания по сей день сохраняется [4, 8]. Во-первых, утрачивается опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии. Во-вторых, существует риск завоза дифтерии с неблагополучных территорий в результате сезонной миграции туристов и трансграничной трудовой миграции, что, в свою очередь, может привести к ухудшению эпидситуации за счет распространения возбудителя среди восприимчивых лиц. В-третьих, эпидемический процесс протекает среди привитого населения. Также продолжают регистрировать случаи заболевания как среди непривитых детей, так и среди непривитых взрослых. Следует отметить тот факт, что в условиях спорадической заболеваемости главная роль в распространении инфекции отводится носителям токсигенных коринибактерий, поскольку они являются резервуаром возбудителя и поддерживают его существование как биологического вида.

Цель настоящей работы — характеристика токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных на территории России в 2017–2019 гг.

## Материалы и методы

В исследование включено 12 токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, полученных в период с января 2017 г. по июнь 2019 г. из бактериологических лабораторий лечебно-профилактических организаций и центров гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ — Новосибирской, Самарской и Челябинской областях, в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре (ХМАО — Югра), в Республике Северная Осетия — Алания. Из них 6 штаммов относились к биовару *gravis* и 6 штаммов — к биовару *mitis*. Все штаммы были выделены при обследовании с диагностической целью.

Изучение штаммов *C. diphtheriae* проводили согласно МУ 4.2.3065-13 «Лабораторная диагно-

стика дифтерийной инфекции». Исследуемый материал засеивали на кровяно-теллуритовую среду на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва) и теллурида калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и термостатировали в течение 24–48 ч при температуре 37°C. Выросшие колонии *C. diphtheriae* оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам. Токсигенность штаммов *C. diphtheriae* оценивали в реакции преципитации в агаре с использованием «Коринетоксагара» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением сыворотки крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва) и дисков, пропитанных дифтерийным антитоксином (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород). Биохимические свойства выделенных культур изучали по оценке цистиназной, уреазной, сахаролитической и нитратредуктазной активностей на средах, приготовленных в лабораторных условиях, а также с использованием набора реагентов «ДС-Диф-Корине» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород).

Хромосомальную ДНК выделяли методом кипячения из 24-часовой культуры *C. diphtheriae*, выращенной на ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10% крови крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва).

Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* с помощью мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) проводили согласно международному протоколу [10] с модификацией на основе секвенирования фрагментов семи генов, являющихся генами «домашнего хозяйства» (house-keeping genes), — *atpA* (ATP — synthase alpha chain), *dnaE* (DNA polymerase III alpha subunit), *dnaK* (chaperone protein), *fusA* (elongation factor G), *leuA* (2-isopropylmalate synthase), *odhA* (2-oxoglutarate dehydrogenase E1 and E2 components) и *rpoB* (DNA-direct RNA polymerase beta chain). Реакционная смесь содержала 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ Tris-HCl (рН 8,3), 50 мМ KCl, 1,0 мкл каждого праймера (по 10 пмоль/мкл), по 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкл ДНК и 1 U Taq DNA-полимеразы (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва) в окончательном объеме 27 мкл. Амплификация фрагментов гена выполнялась в следующем режиме: 96°C — 1 мин; 96°C — 1 мин, 58°C — 1 мин, 72°C — 2 мин (35 циклов); 72°C — 5 мин.

ПЦР для выявления гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae* проводили с использованием одной пары праймеров, охватывающей всю область гена *dtxR*: 5'-GGGACTACAACGCAACAAGAA-3' [14] и 5'-TCATCTAATTTTCGCCGCTTТА-3' [7]. Реакционная смесь содержала 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ Tris-HCl (рН 8,3), 50 мМ KCl, 1,0 мкл каждого праймера (по 10 пмоль/мкл),

по 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкл ДНК и 1 U Taq DNA-полимеразы (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва) в окончательном объеме 25 мкл.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50х TAE-буфере (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве маркера молекулярных весов ДНК использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва). Электрофорез проводили при напряжении 160 В в течение 60 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью геледокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

Секвенирование фрагментов генов *rpoB*, *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* и *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae* проводили согласно общепринятому методу Сэнгера (Sanger F., 1977) в ЗАО «Евроген» (Москва). Идентификацию аллелей осуществляли согласно международной базе данных PubMLST (<http://pubmlst.org>). Для кластерного анализа сиквенс-типов использовали программу построения дерева минимальных расстояний (minimum spanning tree) на основе аллельных профилей с помощью PHYLOViZ 2.0 [15]. Для сравнения последовательностей *dtxR* с известными штаммами из базы данных EMBL/Genbank были взяты публично доступные последовательности геномов 197 штаммов *C. diphtheriae*, а также геном *C. ulcerans* BR-AD22 в качестве внешней группы. Поиск гена *dtxR* проводился путем вычисления групп ортологичных генов с помощью программного обеспечения OrthoMCL 2.0.4 [13]. Реконструкция филогенетического дерева и восстановление предковых последовательностей проводились по алгоритму максимального правдоподобия с использованием модели замен Тамуры–Нея в программном обеспечении MEGA X [12].

## Результаты

В 2017 г. случаи заболевания дифтерией не регистрировали. Выявлено два случая бактерионосительства у детей 6 месяцев и 8 лет в Самарской и Челябинской областях соответственно. Изучение биологических свойств показало, что в обоих случаях обнаружены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis*. Штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, выделенный от 6-месячного ребенка, принадлежал к сиквенс-типу ST25, для которого характерен 5-6-7-6-6-3-8-аллельный профиль генов *atpA-dnaE-dnaK-fusA-leuA-odhA-rpoB* в МЛСТ.

В 2018 г. зарегистрировано четыре случая заболевания дифтерией. Два случая были выявле-

ны в ХМАО — Югре у взрослых 35 и 32 лет, у одного из которых данные о прививках отсутствовали, а другой был привит; заболевание в обоих случаях протекало в легкой форме. Один случай дифтерии зарегистрирован в Новосибирской области у взрослого 58 лет, который был не привит и у которого диагностирована средне-тяжелая форма инфекции. Один случай дифтерии зарегистрирован в Республике Северная Осетия — Алания у взрослого 40 лет, который был привит и у которого диагностирована легкая форма. У заболевших в ХМАО — Югре обнаружены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST67, для которого характерен 3-2-3-6-3-3-2-аллельный профиль в МЛСТ. У заболевшего в Новосибирской области выявлен токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST25, и у заболевшего в Республике Северная Осетия — Алания обнаружен токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST8, для которого характерен 3-5-6-5-3-3-6-аллельный профиль. В 2018 г. зарегистрированы три случая бактерионосительства, один из которых был у ребенка 6 лет. Все случаи бактерионосительства диагностированы у привитых лиц. У взрослых бактерионосителей выявлены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST67, а у ребенка — токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST25.

В 2019 г. в ХМАО — Югре зарегистрировано два случая бактерионосительства у привитых взрослых 35 и 32 лет и один случай заболевания локализованной формой у непривитого ребенка в возрасте 2 лет. У бактерионосителей обнаружены токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis*, принадлежащие к сиквенс-типу ST67, у заболевшего ребенка выявлен токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis*, принадлежащий к сиквенс-типу ST25.

Все обнаруженные сиквенс-типы являются широко распространенными в мире и представлены большим количеством изолятов в базе данных PubMLST, а также характеризуются значительным количеством производных сиквенс-типов (рис. 1). При этом они входят в различные клональные комплексы и значительно отличаются друг от друга, что способствует их надежному различению в МЛСТ. Географическое распространение выявленных сиквенс-типов, по данным МЛСТ, также достаточно велико: штаммы ST8 и ST25 выделялись помимо РФ в Румынии и Беларуси. Также ST8 обнаруживался в Бельгии и Великобритании, ST25 выделялся на Украине. Представители ST67 кроме России выделялись в Бельгии, Франции, Вьетнаме и на Филиппинах.

Для выделенных штаммов был проведен анализ последовательности гена *dtxR* как дополнительного генетического маркера для исследования внутривидовой изменчивости, который потенциально может быть связан с уровнем экспрессии дифтерийного токсина. В результате не было выявлено новых, не встречавшихся ранее аллелей этого гена. Аллель *dtxR*, выявленный у штамма ST8 (группа 6, по данным Чагиной И.А. и соавт. [7]), был типичен для представителей данного сиквенс-типа, таких как NCTC 13129 (идентификатор доступа NCBI Refseq NC\_002935.2), а также представителей ST185, ST195 и ST451. Необходимо отметить, что данный аллель отличается от других встреченных в этом исследовании последовательностью кодируемого белка за счет замен A147V и L214I.

Штаммы ST67 (группа 6, по данным Чагиной И.А. и соавт. [7]) имели одинаковый аллель, объединяющий представителей сиквенс-типов ST67, ST28, ST53, ST141, ST378 и др. Штаммы ST25 имели аллель, характеризующийся заменами T225C, C273T и C639A относительно референсного штамма PW8 (идентификатор доступа NCBI Refseq NC\_016789.1), общий с другими представителями ST25, ST32, ST50, ST395 и др.

Для сравнения аллелей *dtxR* было реконструировано филогенетическое дерево на основании последовательностей генов публично доступных геномных последовательностей (рис. 2), однако внутренние узлы обладали низкими уровнями поддержки, не позволяющими однозначно установить топологию. Было показано, что несинонимичная замена C440T относительно референсной последовательности PW8, приводящая к замене аминокислоты A147V, встречается в пределах только одного аллеля, характерного для представителей сиквенс-типов ST8, ST185, ST195 и ST451, что говорит о поздно произошедшей мутации. Напротив, полиморфизм C640A, приводящий к замене аминокислоты L214I, наличествует не только в данном аллеле, но и в более базальных ветвях дерева, что свидетельствует об изолейцине в 214 положении как о предковом состоянии белка.

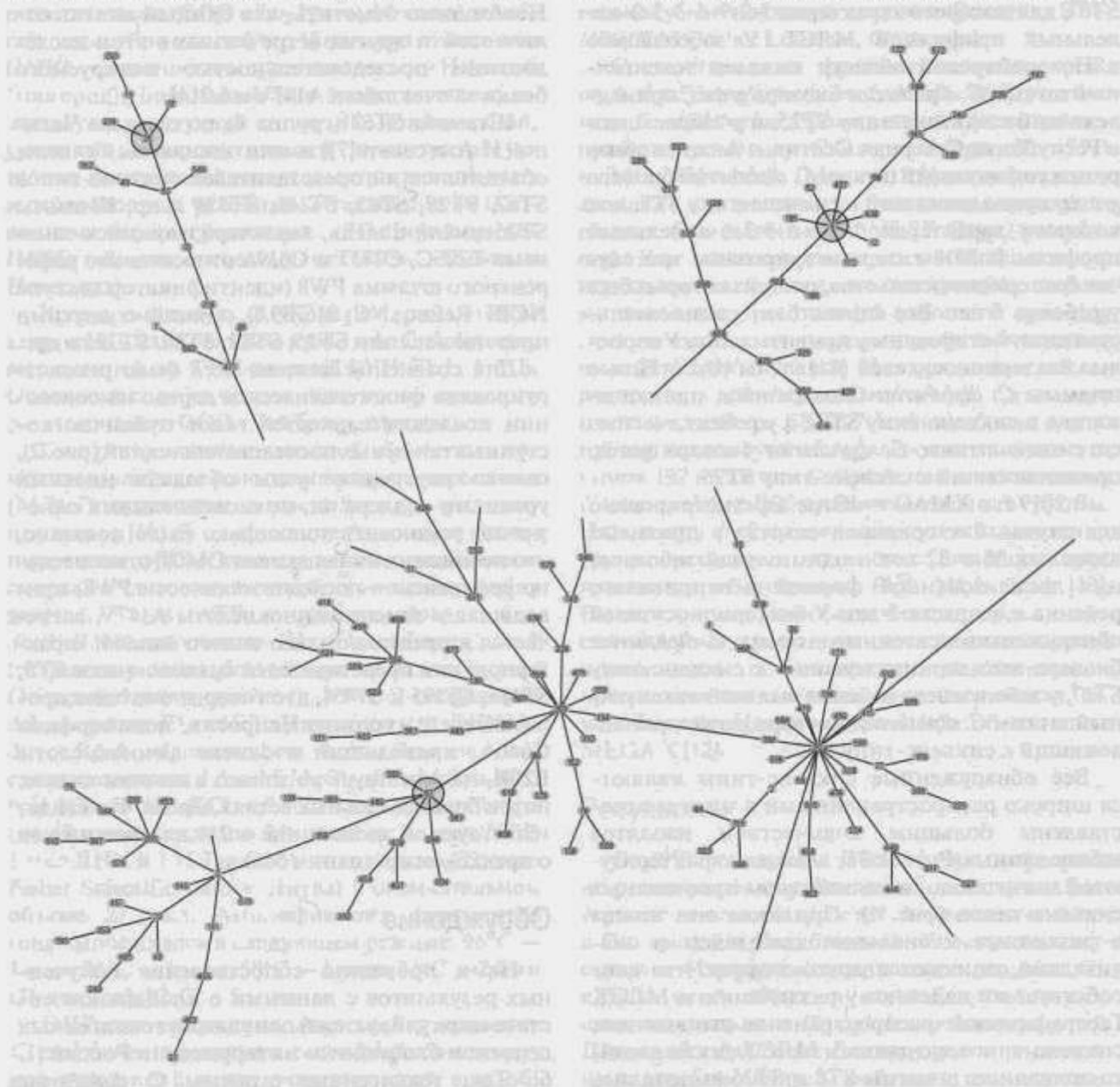
## Обсуждение

Нами проведено сопоставление полученных результатов с данными о клональном составе циркулирующей популяции токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на территории России [1, 6]. Так, токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* сиквенс-типа ST25 выделялись на территории России с 1950-х гг., и они составляли большинство (83%) в циркулирующей популяции. Наряду с ним в 1950–1960-е гг. циркулировали штаммы еще трех сиквенс-

типов — ST5, ST19 и ST62. Сиквенс-тип ST25 характерен и для типового токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, выделенного в 1960-е гг., который используется в качестве контрольного при проведении контроля качества сред первичного посева, при постановке пробы на токсигенность и биохимических тестов. В 1970-е гг. штаммы этого сиквенс-типа продолжали преобладать (57% случаев), однако к концу 1970-х гг. удельный вес штаммов сиквенс-типа ST25 снизился, и увеличился удельный вес штаммов биовара *mitis* ST5 (11%). В последующие годы удельный вес штаммов ST25 не превышал 6%, однако следует отметить, что

штаммы данного сиквенс-типа не исчезают из циркулирующей популяции.

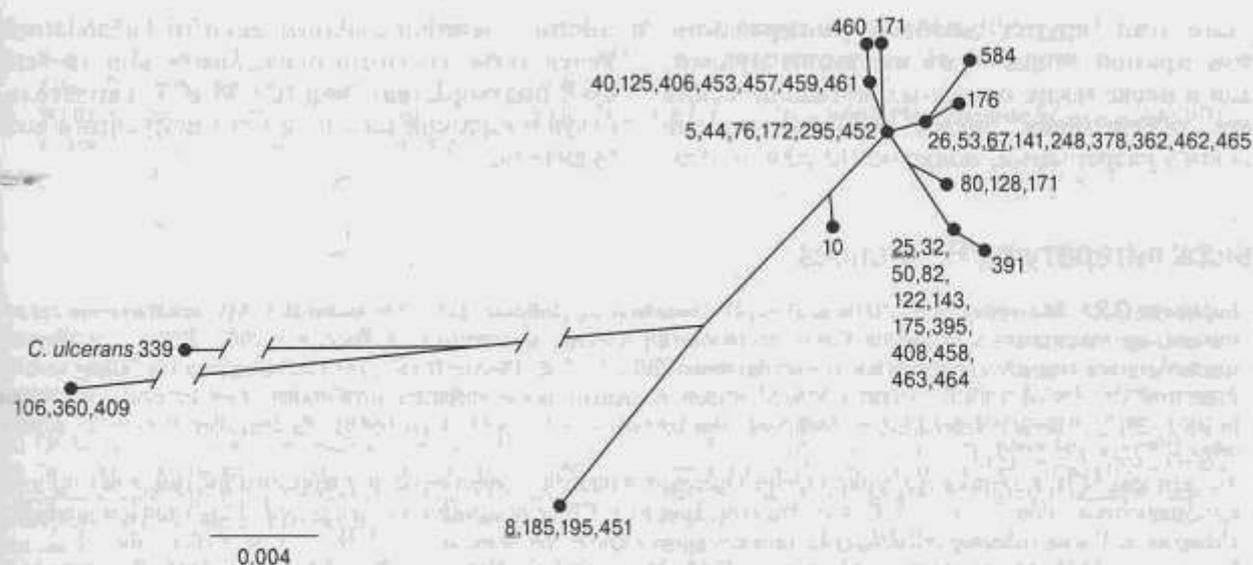
Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST8 стали регистрировать в 11% случаев в циркулирующей популяции в 1980-х гг., когда в клональном составе отмечалось значительное разнообразие и были зарегистрированы штаммы тринадцати сиквенс-типов [6]. В период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией в 1990-х гг. штаммы сиквенс-типа ST8 заняли доминирующее положение (93%). Среди штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в период снижения заболеваемости дифтерией (2000–2009 гг.), зарегистрированы штаммы девяти



**Рисунок 1. Фрагменты минимального остовного дерева, реконструированного с помощью алгоритма goeBURST в программном обеспечении Phyloviz 2.0**

Figure 1. Fragments of Minimum spanning tree reconstructed using goeBURST in PHYLOVIZ 2.0 software

**Примечание.** Сиквенс-типы токсигенных штаммов, выделенных на территории России в 2017–2019 гг., отмечены кругами.  
Note. Sequence types of the toxigenic strains isolated in Russia in 2017–2019 are marked with circles.



**Рисунок 2.** Филогенетическое дерево последовательностей генов *dtxR* в публично доступных геномных последовательностях *C. diphtheriae*, а также *C. ulcerans* BR-AD22 в качестве внешней группы  
 Figure 2. Phylogenetic tree of *dtxR* gene sequences from publicly available genomic sequences *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* BR-AD22 was added as an external group

**Примечание.** В качестве листьев на дереве отмечены сиквенс-типы штаммов, послуживших источником последовательности *dtxR*. Длины ветвей, отмеченных разрывами, сокращены для упрощения восприятия схемы. Шкала отображает оцененное число замен на одну нуклеотидную позицию.

**Note.** Sequence types of strains, used as sources of *dtxR* sequences, are marked as tip labels on the tree. The lengths of branches marked with breaks are shortened to simplify the scheme. Scale bar indicates estimated number of substitutions per nucleotide position.

сиквенс-типов, среди которых по-прежнему доминировали штаммы ST8 (57% случаев).

В 2010–2016 гг. на территории России зарегистрированы штаммы восьми сиквенс-типов [6], из которых практически с одинаковой частотой преобладали штаммы биовара *gravis* сиквенс-типа ST8 и биовара *mitis* сиквенс-типа ST67. Токсигенный штамм сиквенс-типа ST67 впервые на территории России был зарегистрирован в ХМАО — Югре в 2012 г. от бактерионосителя. В 2015 г. на этой территории было идентифицировано три токсигенных штамма этого сиквенс-типа от лиц, не имевших между собой контактов, два из которых выделены от заболевших локализованной формой дифтерии, которые были привиты, и один штамм — от привитого бактерионосителя. В 2016 г. был выделен один токсигенный штамм этого же сиквенс-типа из носа у пациента с острым тонзиллитом.

Обращает на себя внимание тот факт, что токсигенные штаммы *C. diphtheriae* сиквенс-типа ST25 регистрируют на территории РФ, начиная с 1960-х гг. и по настоящее время, что может свидетельствовать о том, что этот сиквенс-тип, наряду с сиквенс-типом ST5, циркулирует постоянно на территории России с определенной частотой, варьируя в различные периоды. В то же время ST8 зарегистрирован на территории России только в 1980-е гг., что может свидетель-

ствовать о ввозе этих штаммов на территорию РФ, где они заняли доминирующее положение в популяции в период эпидемического подъема заболеваемости дифтерией 1990-х гг. и до сих пор выделяются на территории нашей страны [1, 6].

Все обнаруженные сиквенс-типы являются широко распространенными в мире и представлены большим количеством изолятов в базе данных PubMLST. Они входят в различные клональные комплексы, значительно отличающиеся друг от друга, а также характеризуются значительным количеством производных сиквенс-типов. Изучение особенностей структуры гена *dtxR* показало, что все выявленные аллельные варианты гена являются типичными для представителей этих сиквенс-типов, новых аллельных вариантов гена *dtxR* у изученных штаммов не было обнаружено.

Таким образом, в связи с ростом количества случаев дифтерии в эндемичных странах и в странах с широким охватом иммунизацией усиление транспортных и миграционных процессов, а также продолжающаяся циркуляция возбудителя на территории нашей страны, в том числе скрытое бактерионосительство, свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга возбудителя дифтерийной инфекции. Применение МЛСТ решает некоторые проблемы, возникавшие ранее при ис-

пользовании других методов типирования, путем прямой индексации вариаций нуклеотидов в нескольких основных метаболических генах, обеспечивая, таким образом, данные высокого разрешения, подходящие для эволю-

ционных и эпидемиологических исследований. Результаты изучения последовательности гена *dtxR* подтверждают данные МЛСТ, свидетельствуя о высокой клональности популяции возбудителя.

## Список литературы/References

1. Борисова О.Ю., Мазурова И.К., Чагина И.А., Пименова А.С., Донских Е.Е., Алешкин В.А. Мультилокусное секвенирование токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2002–2012 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 4. С. 17–23. [Borisova O.Yu., Mazurova I.K., Chagina I.A., Pimenova A.S., Donskikh E.E., Aleshkin V.A. Multilocus sequencing of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Russia in 2002–2012. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 4, pp. 17–23. (In Russ.)]
2. Корженкова М.П. Клиника дифтерии в период высокой и низкой заболеваемости // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. 2006. Т. 14, № 3. С. 4–6. [Korzhenkova M.P. Clinic of diphtheria in the period of high and low morbidity. *Vaktsinatsia. Novosti vaktsinoprofilaktiki = Vaccination. Vaccine Prevention News*, 2006, vol. 14, no. 3, pp. 4–6. (In Russ.)]
3. Корженкова М.П., Малышев Н.А., Максимова Н.М., Маркина С.С., Черкасова В.В., Шестакова О.М., Базарова М.В. Уроки дифтерии // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011. Т. 42, № 2. С. 30–35. [Korzhenkova M.P., Malyshev N.A., Maksimova N.M., Markina S.S., Cherkasova V.V., Shestakova O.M., Bazarova M.V. The lessons of diphtheria. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2011, vol. 42, no. 2, pp. 30–35. (In Russ.)]
4. Максимова Н.М., Якимова Т.Н., Маркина С.С., Яцковский К.А., Адугюзелов С.Э. Дифтерия в России в 21 веке // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16, № 5 (96). С. 4–15. [Maksimova N.M., Yakimova T.N., Markina S.S., Yatskovsky K.A., Aduguzelov S.E. Diphtheria in Russia in the 21<sup>st</sup> century. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2017, vol. 16, no. 5 (96), pp. 4–15. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-5-4-15
5. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.Л. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. Москва: Медицина, 2003. 664 с. [Pokrovsky V.I., Onischenko G.G., Cherkassky B.L. Evolution of infectious diseases in Russia in the XX<sup>th</sup> century. *Moscow: Medicine*, 2003. 664 p. (In Russ.)]
6. Чагина И.А., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Афанасьев М.С., Алешкин А.В., Юсуф Е.В., Москвина Т.И., Пonomарева Л.И., Караулов А.В. Состав популяции штаммов возбудителя дифтерии, циркулирующих в России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 5. С. 50–60. [Chagina I.A., Borisova O.Yu., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev M.S., Aleshkin A.V., Yusuf E.V., Moskvina T.I., Ponomareva L.I., Karaulov A.V. Composition of population of diphtheria causative agent strains in Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 5, pp. 50–60. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2016-5-50-60
7. Чагина И.А., Переварова Ю.С., Переваров В.В., Чаплин А.В., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Полиморфизм гена *dtxR* у современных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2017. № 1. С. 34–41. [Chagina I.A., Perevarova Yu.S., Perevarov V.V., Chaplin A.V., Borisova O.Yu., Kafarskaya L.I., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. Polymorphism of the *dtxR* gene in the currently existing strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2017, no. 1, pp. 34–41. (In Russ.)] doi: 10.24075/brsmu.2017-01-03
8. Якимова Т.Н., Маркина С.С., Максимова Н.М. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии в России и в субъектах Российской Федерации с 2005–2011 гг. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 87, № 5–1. С. 151–154. [Yakimova T.N., Markina S.S., Maksimova N.M. Epidemiological situation of diphtheria in Russia and in the regions of the Russian Federation since 2005 to 2011. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of East Siberian scientific center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, vol. 87, no. 5–1, pp. 151–154. (In Russ.)]
9. Berger A., Meinel D.M., Schaffer A., Ziegler R., Pitteroff J., Konrad R., Sing A. A case of pharyngeal diphtheria in Germany, June 2015. *Infection*, 2016, vol. 44, no. 5, pp. 673–675. doi: 10.1007/s15010-016-0882-2
10. Both L., Collins S., de Zoysa A., White J., Mandal S., Efstratiou A. Molecular and epidemiological review of toxigenic diphtheria infections in England between 2007 and 2013. *J. Clin. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 2, pp. 567–572. doi: 10.1128/JCM.03398-14
11. Faulkner A., Bozio C.H., Acosta A., Tiwari T.S.P. Diphtheria. In: Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. *CDC*. URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt01-dip.html> (10.08.2019)
12. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
13. Li L., Stoekert C.J., Roos D.S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.*, 2003, vol. 13, no. 9, pp. 2178–2189. doi: 10.1101/gr.1224503
14. Nakao H., Mazurova I.K., Glushkevich T., Popovic T. Analysis of heterogeneity of *Corynebacterium diphtheriae* toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, by direct sequencing. *Res. Microbiol.*, 1997, vol. 148, no. 1, pp. 45–54. doi: 10.1016/S0923-2508(97)81899-2
15. Nascimento M., Sousa A., Ramirez M., Francisco A.P., Carrico J.A., Vaz C. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*, 2017, vol. 33, no. 1, pp. 128–129. doi: 10.1093/bioinformatics/btw582

16. PAHO, WHO. Epidemiological update: Diphtheria. 15 November 2017. *Washington, D.C.: PAHO/WHO, 2017. 2 p.*
17. Skogmar S., Tham J. Severe diphtheria with neurologic and myocardial involvement in a Swedish patient: a case report. *BMC Infect. Dis., 2018, vol. 18, no. 1, p. 359. doi: 10.1186/s12879-018-3264-9*
18. WHO. Review of the epidemiology of diphtheria — 2000–2016. URL: [https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2017/april/presentations\\_background\\_docs/en](https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2017/april/presentations_background_docs/en) (10.08.2019)

**Авторы:**

**Борисова О.Ю.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

**Гадуа Н.Т.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Пименова А.С.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Чаплин А.В.**, к.м.н., научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

**Чагина И.А.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва;

**Урбан Ю.Н.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Максимова Н.М.**, д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории эпиднадзора за дифтерией и коклюшем ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Корженкова М.П.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эпиднадзора за дифтерией и коклюшем ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Афанасьев С.С.**, д.м.н., главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Кафарская Л.И.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

**Афанасьев М.С.**, д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Крикун В.В.**, зав. бактериологической лабораторией БУ ХМАО — Югры Нижневартовская окружная клиническая детская больница, г. Нижневартовск, Россия;

**Якунина О.Ю.**, зав. бактериологической лабораторией ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, г. Новосибирск, Россия.

**Authors:**

**Borisova O.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

**Gadua N.T.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Pimenova A.S.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Chaplin A.V.**, PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

**Chagina I.A.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Urban Y.N.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Maksimova N.M.**, PhD, MD (Medicine), Head Researcher, Laboratory of Epidemiological Surveillance for Diphtheria and Pertussis, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Korzenkova M.P.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Epidemiological Surveillance for Diphtheria and Pertussis, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Afanasiev S.S.**, PhD, MD (Medicine), Head Researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Kafarskaya L.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

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

**Krikun V.V.**, Head of the Bacteriological Laboratory, Nizhnevartovsk District Clinical Children's Hospital, Nizhnevartovsk, Russian Federation;

**Yakunina O.Yu.**, Head of the Bacteriological Laboratory, Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russian Federation.

# РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕПАТИТА Е СРЕДИ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРНОЙ ПРОВИНЦИИ ХА ЗАНГ, ВЬЕТНАМ

Е.В. Личная<sup>1</sup>, Т.Х.Ж. Фам<sup>2</sup>, О.А. Петрова<sup>1</sup>, Т.Н. Чан<sup>2</sup>, Т.Т. Нгуен<sup>3</sup>, Т.Т.Н. Буй<sup>2</sup>,  
В.К. Во<sup>2</sup>, А.В. Дмитриев<sup>4</sup>, О.В. Калинина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Совместный Российско-Вьетнамский тропический научно-технологический центр, Ханой, Вьетнам

<sup>3</sup> Центр по контролю за инфекционными заболеваниями, Ха Занг, Вьетнам

<sup>4</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Вьетнам относится к эндемичным по распространенности вируса гепатита Е территориям Юго-Восточной Азии. Однако данные о распространенности HEV-инфекции среди коренного населения Вьетнама ограничены, а для различных минорных этнических групп отсутствуют. Население северной провинции Ха Занг отличается характерным этническим разнообразием и насчитывает около 22 этнических групп, сохранивших свою этническую самобытность, что определяет особенности их уклада жизни и ведения хозяйства. Целью данной работы было проведение кросс-секционного исследования по оценке распространенности серологических маркеров HEV-инфекции среди коренных жителей северной провинции Вьетнама Ха Занг. *Материалы и методы.* В исследование было включено 1127 коренных жителей в возрасте от 18 до 83 лет (средний возраст — 42,8±1,5), проживавших на территории трех округов (Йен Минь, Бэк Ме и Донг Ван) провинции Ха Занг в 2019 г. Наличие антител к HEV класса IgG (анти-HEV IgG) определяли методом ИФА с использованием набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», Россия). *Результаты.* Частота встречаемости анти-HEV IgG у коренного населения в Ха Занг составила 74,4% (838/1127; 95% CI 71,7–76,8). Наивысшая частота анти-HEV IgG (87,6%) выявлена в округе Донг Ван, что достоверно выше по сравнению с таковой в округах Бэк Ме ( $\chi^2 = 16,37$ ,  $p = 0,000052$ ) и Йен Минь ( $\chi^2 = 214,64$ ,  $p < 0,00001$ ). Округ Йен Минь характеризовался наименьшим процентом лиц, вовлеченных в эпидемический процесс ( $\chi^2 = 77,55$ ,  $p < 0,00001$ ). Достоверных различий выявления анти-HEV в зависимости от пола как во всей провинции, так и в отдельно взятых округах не установлено. В то же время частота встречаемости анти-HEV IgG (85,9%) в этнической группе H'mong была достоверно выше, чем в этнической группе Tay ( $\chi^2 = 77,32$ ,  $p < 0,00001$ ) и по совокупности в остальных минорных этнических группах ( $\chi^2 = 63,44$ ,  $p < 0,00001$ ). *Заключение.* Результаты данного исследования свидетельствуют о высокой активности эпидемического процесса гепатита Е среди коренных жителей северной провинции Вьетнама Ха Занг, принадлежащих к минорным этническим группам, сохраняющим до сих пор традиционный уклад. Поскольку провинция Ха Занг располагается в удаленных, по большей части труднодоступных горных районах страны, ее низкий экономический статус, плохие санитарно-гигиенические условия жизни, отсутствие качественного водоснабжения, многонациональность населения с различными особенностями быта, постоянный контакт населения с природными потенциальными источниками HEV-инфекции способствуют успешному распространению вируса гепатита Е в регионе и вовлечению в эпидемический процесс всех возрастных групп

## Адрес для переписки:

Калинина Ольга Викторовна  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.  
Тел.: 8 (812) 233-21-49.  
E-mail: olgakalinina@mail.ru

## Contacts:

Kalinina Olga Viktorovna  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 (812) 233-21-49.  
E-mail: olgakalinina@mail.ru

## Для цитирования:

Личная Е.В., Фам Т.Х.Ж., Петрова О.А., Чан Т.Н., Нгуен Т.Т., Буй Т.Т.Н.,  
Во В.К., Дмитриев А.В., Калинина О.В. Распространенность гепатита Е  
среди коренного населения северной провинции Ха Занг, Вьетнам //  
Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 692–700. doi: 10.15789/2220-  
7619-HEV-1764

## Citation:

Lichnaia E.V., Pham T.H.G., Petrova O.A., Tran T.N., Nguyen T.T., Bui T.T.N.,  
Vo V.C., Dmitriev A.V., Kalinina O.V. Hepatitis E virus seroprevalence  
in indigenous residents of the Hà Giang northern province of Vietnam //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,  
vol. 11, no. 4, pp. 692–700. doi: 10.15789/2220-7619-HEV-1764

населения. Учитывая быстрые темпы развития индустрии туризма в провинции Ха Занг, на территории которой располагается геопарк «Плато Донг Ван Карст», признанный ЮНЕСКО национальным достоянием Вьетнама, полученные результаты подчеркивают необходимость планирования и проведения мероприятий, направленных на профилактику и мониторинг HEV-инфекции в эндемичных регионах страны с целью снижения риска распространения вируса гепатита Е не только в стране, но и за ее пределами.

**Ключевые слова:** гепатит Е, анти-HEV IgG, серопревалентность, провинция Ха Занг, Вьетнам, этнические группы.

## HEPATITIS E VIRUS SEROPREVALENCE IN INDIGENOUS RESIDENTS OF THE HÀ GIANG NORTHERN PROVINCE OF VIETNAM

Lichnaia E.V.<sup>a</sup>, Pham T.H.G.<sup>b</sup>, Petrova O.A.<sup>a</sup>, Tran T.N.<sup>b</sup>, Nguyen T.T.<sup>c</sup>, Bui T.T.N.<sup>b</sup>, Vo V.C.<sup>b</sup>, Dmitriev A.V.<sup>d</sup>, Kalinina O.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Joint Russian-Vietnamese Tropical Science and Technology Center, Hanoi, Vietnam

<sup>c</sup> Hà Giang CDC, Hà Giang, Vietnam

<sup>d</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Vietnam is an endemic territory of the South-East Asia in terms of the prevalence of hepatitis E virus. However, the data on the prevalence of HEV infection among the indigenous population of Vietnam are limited, whereas the data on various minor ethnic groups are not available. Population of the Northern province Hà Giang is characterized by ethnic diversity and consists of about 22 ethnic groups that have preserved their ethnic identity determining the features of their lifestyle and farming. The goal of the current study was to conduct a cross-sectional examination to assess prevalence of serological markers of HEV infection in the indigenous population of the Northern province of Vietnam, Hà Giang. **Materials and methods.** A total of 1127 healthy indigenous residents aged 18 to 83 years (average age 42.8±1.5) who lived in three regions (Yên Minh, Bắc Mê and Đông Văn) of Hà Giang province in 2019 were enrolled in the study. The presence of HEV-specific IgG antibodies (anti-HEV IgG) was determined by the ELISA using kits "DS-IFA-ANTI-HEV-G" (LLC NPO "Diagnostic Systems", Russia). **Results.** The prevalence of anti-HEV IgG antibodies in the indigenous population in the Hà Giang province was 74.4% (838/1127; 95% CI 71.7–76.8), with the peak occurrence of anti-HEV IgG (87.6%) found in Đông Văn region, which was significantly higher compared to those in the Bắc Mê ( $\chi^2 = 16.37$ ,  $p = 0.000052$ ) and Yên Minh ( $\chi^2 = 214.64$ ,  $p < 0.00001$ ) regions. The Yên Minh Region was characterized by the lowest percentage of subjects involved in the epidemic process ( $\chi^2 = 77.55$ ,  $p < 0.00001$ ). No significant gender-related differences were detected in anti-HEV IgG level both in general and in individual regions. The peak frequency of anti-HEV IgG (85.9%) was found in the H'mong ethnic group, which was significantly higher than in the Tay ethnic groups ( $\chi^2 = 77.32$ ,  $p < 0.00001$ ) and in the remaining minor ethnic groups ( $\chi^2 = 63.44$ ,  $p < 0.00001$ ). **Conclusion.** The results of this study indicate a high seroprevalence of hepatitis E virus in the minor ethnic groups, which preserve the national lifestyle in the Hà Giang province of the Northern Vietnam. As the Hà Giang province is located in remote mountain areas, a number of which are still difficult to access, its low economic status, poor sanitary and hygienic living conditions, lack of high-quality water supply, multinational population following different lifestyles, the contact of population with natural potential sources of HEV infection, including various wild and domestic animals, contribute to the successful spread of the hepatitis E virus in the region and the involvement of all populational age groups in the epidemic process. Taking into account the rapid development of the tourism industry in the Hà Giang Province particularly in the Đông Văn Region, where the Đông Văn Karst Plateau Geopark being recognized by UNESCO as national treasure is located, the results of this study emphasize a need to plan and perform the events aimed for preventing and monitoring HEV infection in endemic regions in Vietnam in order to reduce a risk of spread of hepatitis E virus not only inside, but also outside the country.

**Key words:** hepatitis E, anti-HEV IgG, seroprevalence, Hà Giang, Vietnam, ethnic groups.

## Введение

Проблема энтеральных вирусных гепатитов по-прежнему остается актуальной во всем мире. По оценкам ВОЗ, ежегодно около 20 млн человек инфицируются ВГЕ [16]. Вирусный гепатит Е (ГЕ) имеет повсеместное распространение, выделяют районы с более высокой (страны Восточной и Южной Азии, Африки, Латинской Америки) и низкой (промышленно развитые страны) эндемичностью. В эндемичных странах

в эпидемиологический процесс вовлечены, как правило, все возрастные группы населения, что связано как с ограничениями в области водоснабжения, нарушениями санитарно-гигиенических условий, так и с особенностями образа жизни населения. На неэндемичных территориях циркуляция ВГЕ обусловлена, как правило, завозом возбудителя из эндемичных районов, а также спорадически ассоциирована с контактами с зараженными животными или употреблением в пищу зараженного мяса [11, 12].

Изначально гепатит E был описан как острое заболевание, для которого характерно бессимптомное или легкое течение и самопроизвольное выздоровление в большинстве случаев. Многие клинические проявления инфекционного процесса схожи с симптомами вирусного гепатита A, однако степень проявления некоторых из них различна. Хронизация GE с быстрым прогрессированием фиброза печени, приводящим к циррозу, и развитие фульминантных форм гепатита наблюдается крайне редко и только у лиц с ослабленным иммунитетом (пациенты после трансплантации органов, пациенты с онкологическими заболеваниями, с ВИЧ-инфекцией), а также при сопутствующей тяжелой хронической патологии печени [9]. Особую опасность вирус гепатита E (HEV) представляет для беременных. Сложные гормональные и иммунологические изменения во время беременности провоцируют более тяжелое течение острого GE, особенно во втором и третьем триместре с летальностью до 20–25% [10, 13]. Наиболее частым осложнением острого GE во время беременности является самопроизвольное ее прерывание (выкидыш или преждевременные роды). Кроме того перенесенный во время беременности GE может приводить к гибели новорожденного на первой неделе жизни. Установлена корреляция между репликацией HEV в плаценте и смертностью беременных с острой печеночной недостаточностью [2]. Однако истинная причина таких исходов при GE у беременных остается неизвестной.

Вирус гепатита E относится к семейству *Hepadnaviridae*, род *Orthohepevirus*, в составе которого выделяют 4 вида: A, B, D и C. Возбудителями вирусного гепатита E у человека являются представители вида *Orthohepevirus A*. ВGE — один из наиболее гетерогенных вирусов, в настоящее время изоляты вида *Orthohepevirus A* подразделяют на 8 генотипов, при этом только 5 из них (HEV-1, HEV-2, HEV-3, HEV-4, HEV-7) обладают тропностью к гепатоцитам человека [14]. В свою очередь генотипы HEV делятся на субтипы, также доказано существование рекомбинантных форм вируса [15]. Установлена связь между генотипами HEV и тяжестью течения заболевания у беременных [6].

Вирус гепатита E представляет собой небольшой безоболочечный вирион размером около 27–34 нм, содержащий в качестве генома одноцепочечную (+) РНК размером 7200 нуклеотидных оснований, кодирующую три прерывистые и частично перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORFs) [14]. Недавно было установлено, что вирионы HEV, циркулирующие в крови, заключены в экзосомы, что способствует их ускользанию от факторов иммунной защиты человека [3].

На сегодняшний день основными мерами профилактики GE являются общегигиенические и санитарные мероприятия, направленные на снижение риска инфицирования и передачи инфекции. К ним относят соблюдение правил личной гигиены, контроль за общественным питанием, использование доброкачественной питьевой воды, совершенствование системы водоснабжения и канализации, информирование выезжающих в эндемичные по GE районы о рисках возможного заражения HEV. В Китае в 2011 г. для профилактики HEV-инфекции была разработана рекомбинантная вакцина Hecolin® (HEV239) на основе генотипа HEV-1 [18, 20]. Было показано, что 87% вакцинированных пациентов имели протективные антитела на протяжении 4,5 лет после трехкратного введения вакцины (0, 1 и 6 мес.), также было установлено наличие перекрестного иммунитета к генотипу HEV-4 [17, 19].

Вьетнам относится к эндемичным по распространенности GE территориям Юго-Восточной Азии. Однако данные о распространенности ВGE-инфекции среди населения Вьетнама ограничены. В силу большой протяженности страны с севера на юг провинции Вьетнама отличаются по климатическим и социально-экономическим условиям, что в совокупности сказывается как на распространенности инфекционных заболеваний, так и на доступности лабораторной диагностики и квалифицированной медицинской помощи для населения страны. По данным переписи населения в 2019 г., во Вьетнаме проживают 54 этнические группы с общей численностью населения около 96 млн, из которых 65,6% являются сельскими жителями [4].

Целью данной работы было проведение кросс-секционного исследования по оценке распространенности серологических маркеров HEV-инфекции среди коренных жителей северной провинции Вьетнама Ха Занг.

## Материалы и методы

В исследование было включено 1127 условно здоровых коренных жителей в возрасте от 18 до 83 лет (средний возраст —  $42,8 \pm 1,5$ ), проживавших на территории трех округов (Йен Минь, Бэк Ме и Донг Ван) провинции Ха Занг в 2019 г. В исследуемой группе число мужчин и женщин составило 330 (29,3%) и 797 (70,7%) соответственно (табл. 1). Распределение участников исследования по возрастным группам в зависимости от округа представлено в табл. 2. Все образцы плазмы крови были получены для научного исследования под кодовыми наименованиями согласно Хельсинкской декларации, алиquotированы и хранились при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до начала проведения исследования.

Наличие специфических антител к HEV класса IgG (анти-HEV IgG) определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» в соответствии с инструкцией производителя (НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород, Россия).

Границы доверительного интервала (95% CI) рассчитывали по методу Уилсона (Wilson). Для оценки статистической значимости различий между группами для качественных признаков применялся критерий  $\chi^2$ . Статистически значимыми считали различия показателей при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В данном исследовании частота встречаемости анти-HEV IgG среди условно здорового коренного населения в северной провинции Ха Занг составила 74,4% (838/1127; 95% CI 71,7–76,8). При этом между всеми тремя округами Йен Минь, Бэк Ме и Донг Ван наблюдались статистически значимые различия (табл. 3). Наивысшая частота встречаемости анти-HEV IgG (87,6%) среди обследованных жителей выявлена в округе Донг Ван, что достоверно выше по сравнению с таковой в округах Бэк Ме ( $\chi^2 = 16,37$ ,  $p = 0,000052$ ) и Йен Минь ( $\chi^2 = 214,64$ ,  $p < 0,00001$ ). Округ Йен Минь характеризовался наименьшим процентом лиц, вовлеченных в эпидемический процесс ( $\chi^2 = 77,55$ ,  $p < 0,00001$ ).

Соотношение по полу и возрасту обследованных жителей указанных территорий было сопоставимо, они имели сходный социальный статус и консервативный образ жизни. Несмотря на то, что соотношение мужчин и женщин не было равномерным, во всех трех округах две трети обследованных составляли женщины (табл. 1), достоверных различий выявления анти-ВГЕ в зависимости от пола как во всей провинции, так и в отдельно взятых округах не установлено (рис. 1).

В то же время в результате комплексного анализа, проведенного в нашем исследовании, установлено, что частота выявления анти-HEV

**Таблица 1. Распределение участников исследования по гендерному признаку в трех округах провинции Ха Занг**

Table 1. Gender-related distribution of subjects in three regions of the Hà Giang Province

Округ Region	Всего обследованных Total examined subjects	Мужчины, n (%) Males, n (%)	Женщины, n (%) Females, n (%)
Йен Минь Yên Minh	247	71 (28,7)	176 (71,3)
Бэк Ме Bắc Mê	273	80 (29,3)	193 (70,7)
Донг Ван Đông Văn	607	179 (29,5)	428 (70,5)
<b>Всего</b> Total	1127	330 (29,3)	797 (70,7)

среди молодых людей в возрастной группе 18–19 лет, несмотря на немногочисленную выборку, отличалась в зависимости от округа проживания и варьировала от 12,5 до 66,7% (рис. 2). Наиболее высокие показатели доли анти-HEV-положительных лиц наблюдались в возрастных группах старше 20 лет в округе Донг Ван. Частота выявления анти-HEV в округе Йен Минь в возрастной группе 20–29 лет была статистически ниже, чем в округе Донг Ван ( $\chi^2 = 19,8775$ ,  $p < 0,00001$ ), а в более старших возрастных группах ниже, чем в округах Бэк Ме ( $\chi^2 = 13,15$ ,  $p = 0,000287$ ) и Донг Ван ( $\chi^2 = 206,99$ ,  $p < 0,00001$ ). Тогда как значимых различий по частоте выявления анти-HEV в зависимости от возраста между регионами Бэк Ме и Донг Ван не наблюдалось: в обоих округах была отмечена стабильная тенденция к увеличению с возрастом доли лиц, вовлеченных в эпидемический процесс.

Учитывая высокий удельный вес населения, вовлеченного в сельское хозяйство, основную часть обследованных участников составили фермеры (95,2%). Для выявления возможных факторов риска инфицирования, связанных с профессиональной деятельностью, были выделены до-

**Таблица 2. Возрастная структура участников исследования в трех округах провинции Ха Занг**

Table 2. Age-related pattern of the examined subjects in three regions of the Hà Giang Province

Округ Region	Всего обследованных Total examined subjects	Средний возраст, лет Mean age, years	Возрастные группы, лет Age group, years				
			18–19, n (%)	20–29, n (%)	30–39, n (%)	40–49, n (%)	> 50, n (%)
Йен Минь Yên Minh	247	42,7±1,7	8 (3,2)	40 (16,2)	60 (24,3)	54 (21,9)	85 (34,4)
Бэк Ме Bắc Mê	273	45,0±1,6	3 (1,1)	42 (15,4)	60 (22,0)	57 (20,9)	111 (40,7)
Донг Ван Đông Văn	607	40,8±1,2	22 (3,6)	130 (21,4)	170 (28,0)	130 (21,4)	155 (25,5)
<b>Всего</b> Total	1127	42,8±1,5	33 (2,9)	212 (18,8)	290 (25,7)	241 (21,4)	351 (31,1)

**Таблица 3. Частота выявления анти-HEV IgG у обследованного населения в трех округах провинции Ха Занг**

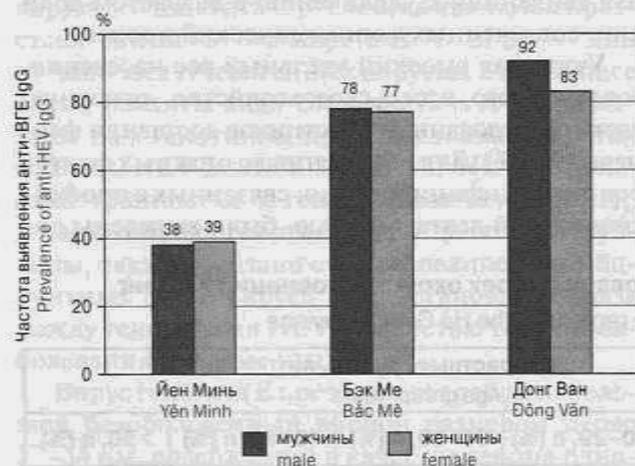
Table 3. Prevalence of anti-HEV IgG antibodies in the examined residents of three regions in the Hà Giang Province

Округ Region	Количество, n Number, n	анти-HEV (+), n anti-HEV (+), n	% (95% CI)
Йен Минь Yên Minh	247	96	38,9 (33,0–45,1)
Бэк Ме Bắc Mê	273	210	76,9 (71,6–81,5)
Донг Ван Đông Văn	607	532	87,6 (84,8–90,0)
<b>Всего</b> Total	1127	838	74,4 (71,7–76,8)

**Примечание.** Статистически значимые различия между округами Донг Ван и Бэк Ме ( $p < 0,05$ ); Донг Ван и Йен Минь ( $p < 0,05$ ); Бэк Ме и Йен Минь ( $p < 0,05$ ).

Note. Significant differences between regions Đông Văn and Bắc Mê ( $p < 0,05$ ), Đông Văn and Yên Minh ( $p < 0,05$ ), Bắc Mê and Yên Minh ( $p < 0,05$ ).

полнительно следующие группы: учителя (1,7%), медицинские работники (1,6%) и представители других профессий, в том числе офис-менеджеры, домохозяйки, почталыоны, полицейские (1,5%). Изучение частоты встречаемости анти-HEV в зависимости от рода профессиональной деятельности обследованных не выявило статистически достоверных различий между сравниваемыми группами (рис. 3), что свидетельствует в пользу



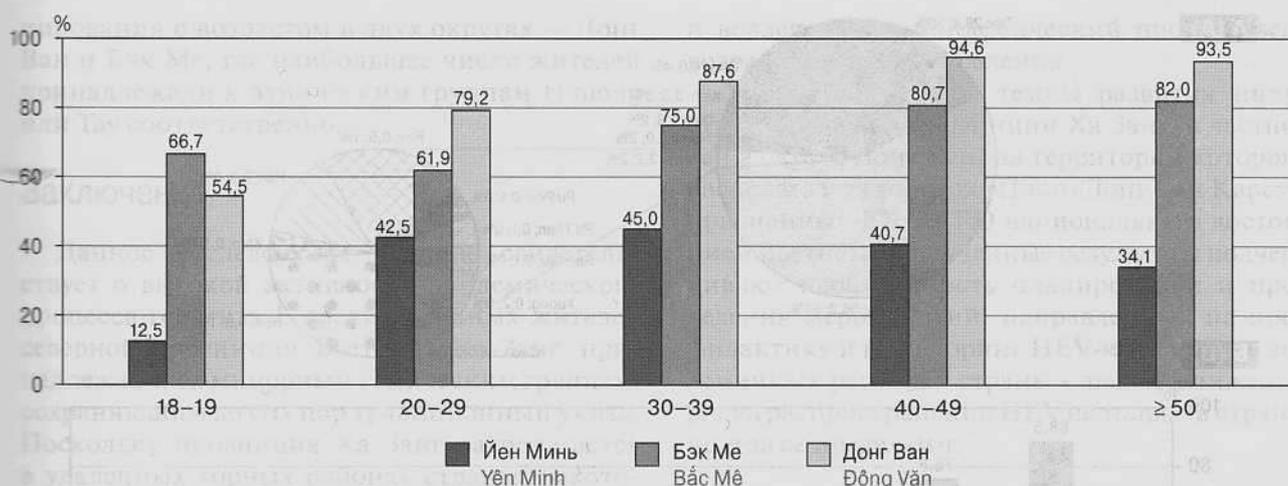
**Рисунок 1. Частота выявления анти-HEV IgG в зависимости от пола у обследованного населения в округах Йен Минь, Бэк Ме и Донг Ван провинции Ха Занг**

Figure 1. Gender-related prevalence of anti-HEV IgG antibodies in the examined residents of the regions Yên Minh, Bắc Mê and Đông Văn in the Hà Giang Province

региональных эколого-социальных причин широкого распространения HEV-инфекции в провинции Ха Занг.

Данных о распространенности HEV-инфекции на территории Вьетнама, особенно среди сельских жителей страны, в настоящее время недостаточно. В кросс-секционном исследовании, проведенном Ноап и соавт. в 2012–2013 гг. на севере Вьетнама в г. Ханой, показано, что среди здоровых жителей частота встречаемости анти-HEV IgG составила 31%, тогда как у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ) достигла 45%, при этом наибольшая частота анти-HEV IgG наблюдалась у пациентов с ХГВ и циррозом печени, что свидетельствовало о кумулятивном вкладе вирусных гепатитов в прогрессирование заболеваний печени [8]. Спустя три года, в 2016–2017 гг., в г. Ханой у людей, контактирующих в силу своей профессиональной деятельности с мясом свиней, зарегистрирована наиболее высокая частота распространения анти-HEV, в частности этот показатель варьировал от 38% среди продавцов свинины до 66% среди персонала скотобоен, у фермеров был на уровне 51% [7]. Группа Верто и соавт. при исследовании в 2012–2014 гг. образцов плазмы крови, полученных от фермеров и членов их семей, ветеринаров, животноводов и рабочих скотобоен различных хозяйств ( $n = 281$ ), проживавших в южной провинции Вьетнама Dong Thap, в совокупности выявили только 16,0% анти-HEV-положительных лиц [1]. В то же время в этом же исследовании частота встречаемости анти-HEV среди пациентов ( $n = 1,726$ ) центрального госпиталя провинции Dong Thap, которые косвенно представляли собой срез всей популяции данной провинции, составила 31,7%, что указывало на высокую распространенность HEV-инфекции на юге Вьетнама [1]. Как видно из вышеприведенных литературных данных, ни в одном регионе Вьетнама частота распространения HEV, в том числе среди лиц из групп риска по профессиональной деятельности, не достигала таких высоких показателей, как у коренного населения северной провинции Ха Занг, где доля анти-HEV-положительных лиц, занятых в фермерском хозяйстве, составила 75,3% (рис. 4).

Принимая во внимание особенности быта, в том числе санитарных условий проживания, в разных этнических группах и их возможный вклад в распространение вируса гепатита E в провинции Ха Занг, был проведен комплексный анализ частоты обнаружения анти-HEV IgG среди этнических групп на всех обследованных территориях. Население провинции Ха Занг отличается характерным этническим разнообразием и насчитывает около 22 этнических групп. Преобладающая на других территориях страны национальность Kinh (вьеты) не превышает 15%

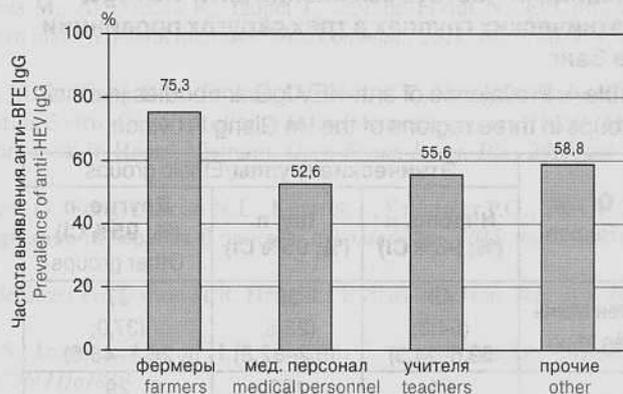


**Рисунок 2. Частота выявления анти-HEV IgG среди различных возрастных групп участников исследования в трех округах провинции Ха Занг**

Figure 2. Prevalence of anti-HEV IgG antibodies in various age groups in three regions of the Hà Giang Province

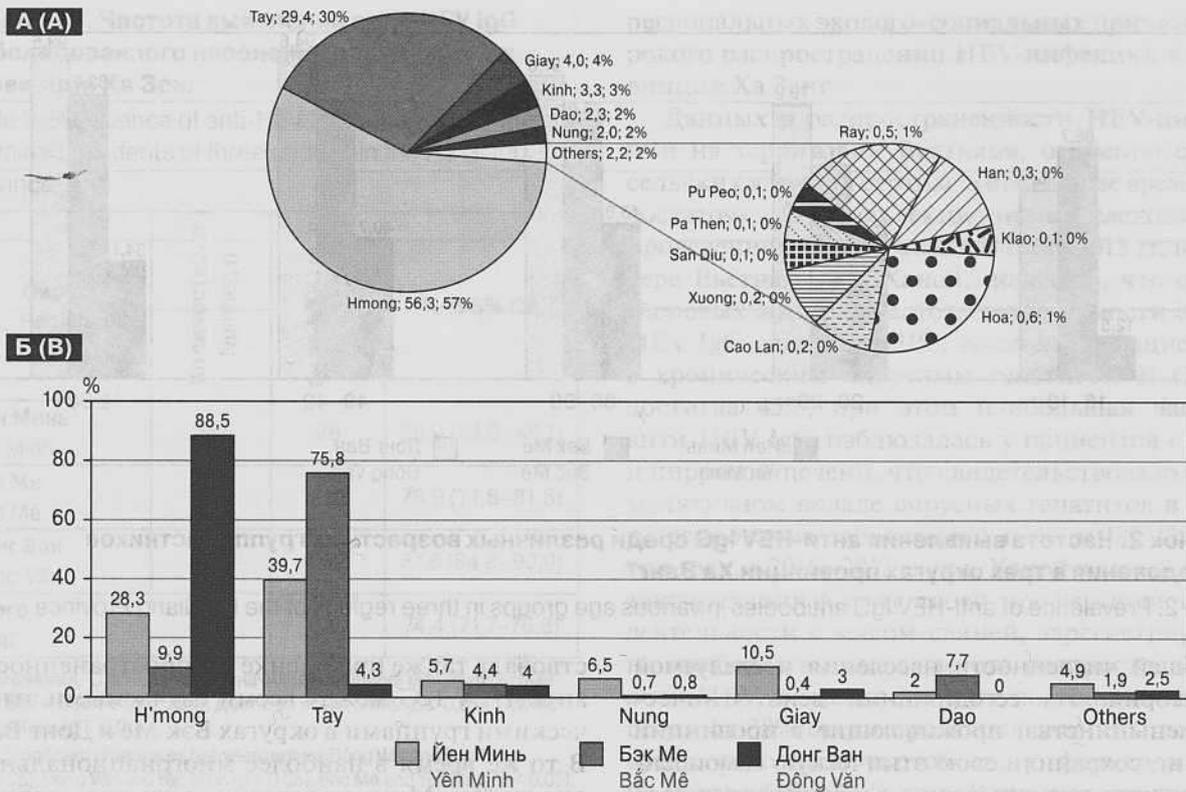
от общей численности населения исследуемой территории. На сегодняшний день этнические меньшинства, проживающие в провинции Ха Занг, сохранили свою этническую самоидентификацию, что определяет особенности уклада их жизни и ведения хозяйства. Для них характерны социально-географическая изоляция, низкий уровень образования, ограниченный доступ к качественному медицинскому обслуживанию, несмотря на реализуемые программы на уровне государства. В нашем исследовании преобладающая часть обследованных принадлежала к большим этническим группам Н'монг (56,3%) и Тау (29,4%) (рис. 4А). Национальные меньшинства были также представлены Giáy — 4,0%, Kinh — 3,3%, Dao — 2,3%, Nung — 2,0% и другими малочисленными этническими группами — 2,7%, в том числе представителями двух редких сокращающихся групп — Pu Peo и Pa Then численностью менее 800 человек (согласно переписи населения в 2019 г.). Следует отметить, что в округе Бэк Ме большинство обследованных принадлежали к этнической группе Тау, в округе Донг Ван — к этнической группе Н'монг, тогда как округ Йен Минь отличался наиболее неоднородным составом (рис. 4Б). Учитывая, что во всех трех округах подавляющее большинство составляли две этнические группы — Н'монг и/или Тау, представители остальных минорных этнических групп были объединены в общую группу сравнения (далее «другие»). Наибольшая частота встречаемости анти-HEV IgG (85,9%) выявлена в этнической группе Н'монг, что было достоверно выше, чем в этнических группах Тау ( $\chi^2 = 77,32$ ,  $p < 0,00001$ ) и «другие» ( $\chi^2 = 63,44$ ,  $p < 0,00001$ ) (табл. 4). При этом внутри этнической группы Н'монг значимых отличий в зависимости от округа проживания не наблюдалось (табл. 4). Статистическая достоверность отсут-

ствовала также при оценке распространенности анти-HEV IgG между всеми изучаемыми этническими группами в округах Бэк Ме и Донг Ван. В то же время в наиболее многонациональном округе Йен Минь прослеживались достоверные различия по частоте встречаемости анти-HEV IgG в этнической группе Н'монг по сравнению с другими этническими группами ( $p < 0,0011$ ). Полученные результаты указывают на то, что в округах Бэк Ме и Донг Ван все этнические группы имеют одинаковые факторы риска распространения HEV-инфекции, тогда как в округе Йен Минь многонациональность населения обуславливает большую изолированность между коммунами, что, в свою очередь, возможно, влияет на стратификацию рисков в зависимости от условий быта.



**Рисунок 3. Частота выявления анти-HEV IgG в зависимости от профессиональной деятельности участников исследования в провинции Ха Занг**

Figure 3. Prevalence of anti-HEV IgG antibodies related to professional occupation in residents of the Hà Giang Province



**Рисунок 4. А. Этнический состав участников исследования в провинции Ха Занг.**

**Б. Доля обследованных этнических групп в каждом из трех округов провинции Ха Занг**

Figure 4. A. Ethnic composition of subjects in the Hà Giang Province. B. Percentage of subjects in diverse ethnic groups in each region of the Hà Giang Province

Полученные данные соответствуют результатам скринингового исследования, проведенного на юго-западе Китая в 2015 г. в провинции Юньнань, которая граничит с северной провинцией Ха Занг Вьетнама и также отлича-

ется большим разнообразием этнических групп [5]. Исследование проводилось в трех префектурах среди представителей (n = 1912) четырех минорных этнических групп, исторически проживающих на данной территории. В целом частота распространения анти-HEV в провинции Юньнань равнялась 66,58%. При этом мультифакторный анализ установил четкую статистически значимую связь между этнической принадлежностью участников исследования и распространенностью серологических маркеров HEV. Частота выявления анти-HEV IgG в этнической группе Hani достигала 82,3% (401/487), в этнической группе Naxi — 71,9% (340/473), в этнической группе Bulang — 65,1% (302/464), в этнической группе Wa — 60,2% (294/488) (p < 0,0001) [5], что сопоставимо с результатами, полученными в нашем исследовании в 2019 г. в провинции Ха Занг между этнической группой H'mong и представителями других этнических меньшинств. В провинции Юньнань с риском перенесенной HEV-инфекции были независимо связаны пожилой возраст и мужской пол, тогда как в нашем исследовании различий по встречаемости анти-HEV IgG по гендерному признаку не было выявлено, но при этом прослеживалась тенденция увеличения риска инфи-

**Таблица 4. Частота выявления анти-HEV IgG в этнических группах в трех округах провинции Ха Занг**

Table 4. Prevalence of anti-HEV IgG antibodies in ethnic groups in three regions of the Hà Giang Province

Округ Region	Этнические группы/Ethnic groups		
	H'mong, n (%; 95% CI)	Tay, n (%; 95% CI)	Другие, n (%; 95% CI) Other groups
Йен Минь Yên Minh	45 (64,3; 52,6–74,5)	23 (23,5; 16,2–32,8)	27 (37,0; 26,8–48,5)
Бэк Ме Bắc Mê	21 (77,8; 59,2–89,4)	160 (77,3; 71,1–82,5)	29 (74,4%; 58,9–85,4)
Донг Ван Đông Văn	479 (89,2; 86,3–91,6)	19 (73,1; 53,9–86,3)	34 (77,3; 63,0–87,2)
<b>Всего</b> Total	<b>545</b> (85,9; 83,0–88,5)	<b>202</b> (61,0; 55,7–66,1)	<b>90</b> (57,7; 49,9–65,2)

цирования с возрастом в двух округах — Донг Ван и Бэк Ме, где наибольшее число жителей принадлежали к этническим группам Н'тмонг или Тау соответственно.

## Заключение

Данное исследование впервые свидетельствует о высокой активности эпидемического процесса гепатита Е среди коренных жителей северной провинции Вьетнама Ха Занг, принадлежащих к минорным этническим группам, сохраняющим до сих пор традиционный уклад. Поскольку провинция Ха Занг располагается в удаленных горных районах страны, некоторые из которых до сих пор труднодоступны, ее низкий экономический статус, плохие санитарно-гигиенические условия, отсутствие качественного водоснабжения, многонациональность населения с различными особенностями быта, постоянный контакт населения с природными потенциальными источниками HEV-инфекции, в том числе разнообразными дикими и домашними животными, способствуют успешному распространению HEV в регионе

и вовлечению в эпидемический процесс всех возрастных групп населения.

Учитывая быстрые темпы развития индустрии туризма в провинции Ха Занг, в частности в округе Донг Ван, на территории которого располагается геопарк «Плато Донг Ван Карст», признанный ЮНЕСКО национальным достоянием Вьетнама, полученные результаты подчеркивают необходимость планирования и проведения мероприятий, направленных на профилактику и мониторинг HEV-инфекции в эндемичных регионах страны с целью снижения риска распространения HEV не только в стране, но и за ее пределами.

## Благодарности

Исследование выполнено в рамках программы российско-вьетнамского сотрудничества, направленной на реализацию Распоряжения Правительства Российской Федерации от 13.07.2019 г. № 1536-р за счет бюджетных ассигнований на оказание научно-методической и материально-технической поддержки Социалистической Республике Вьетнам.

## Список литературы/References

- Berto A., Pham H.A., Thao T., Vy N., Caddy S.L., Hiraide R., Tue N.T., Goodfellow I., Carrique-Mas J.J., Thwaites G.E., Baker S., Boni M.F., VIZIONS consortium. Hepatitis E in southern Vietnam: seroepidemiology in humans and molecular epidemiology in pigs. *Zoonoses Public Health*, 2018, vol. 65, no. 1, pp. 43–50. doi: 10.1111/zph.12364
- Bose P.D., Das B.C., Hazam R.K., Kumar A., Medhi S., Kar P. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *J. Gen. Virol.*, 2014, vol. 95 (pt 6), pp. 1266–1271. doi: 10.1099/vir.0.063602-0
- Chapuy-Regaud S., Dubois M., Plisson-Chastang C., Bonnefois T., Lhomme S., Bertrand-Michel J., You B., Simoneau S., Gleizes P.E., Flan B., Abravanel F., Izopet J. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie*, 2017, vol. 141, pp. 70–79. doi: 10.1016/j.biochi.2017.05.003
- Công bố kết quả Tổng điều tra dân số 2019. URL: <https://web.archive.org/web/20190905113157/http://tongdieutradanso.vn/cong-bo-ket-qua-tong-dieu-tra-dan-so-2019.html> (05.07.2021)
- Feng Y., Feng Y.M., Wang S., Xu F., Zhang X., Zhang C., Jia Y., Yang W., Xia X., Yin J. High seroprevalence of hepatitis E virus in the ethnic minority populations in Yunnan, China. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 5: e0197577. doi: 10.1371/journal.pone.0197577
- Gouilly J., Chen Q., Siewiera J., Cartron G., Levy C., Dubois M., Al-Daccak R., Izopet J., Jabrane-Ferrat N., El Costa H. Genotype specific pathogenicity of hepatitis E virus at the human maternal-fetal interface. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1: 4748. doi: 10.1038/s41467-018-07200-2
- Hoan N.X., Huy P.X., Sy B.T., Meyer C.G., Son T.V., Binh M.T., Giang D.P., Tu Anh D., Bock C.T., Wang B., Tong H.V., Kremsner P.G., Song L.H., Toan N.L., Velavan T.P. High hepatitis E virus (HEV) positivity among domestic pigs and risk of HEV infection of individuals occupationally exposed to pigs and pork meat in Hanoi, Vietnam. *Open Forum Infect. Dis.*, 2019, vol. 6, no. 9: ofz306. doi: 10.1093/ofid/ofz306
- Hoan N.X., Tong H.V., Hecht N., Sy B.T., Marcinek P., Meyer C.G., Song L., Toan N.L., Kurreck J., Kremsner P.G., Bock C.T., Velavan T.P. Hepatitis E virus superinfection and clinical progression in hepatitis B patients. *EBioMedicine*, 2015, vol. 2, no. 12, pp. 2080–2086. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.020
- Kamar N., Izopet J., Pavio N., Aggarwal R., Labrique A., Wedemeyer H., Dalton H.R. Hepatitis E virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2017, vol. 3: 17086. doi: 10.1038/nrdp.2017.86
- Kamar N., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Xia N.S., Ijaz S., Izopet J., Dalton H.R. Hepatitis E. *Lancet (London, England)*, 2012, vol. 379, no. 9835, pp. 2477–2488. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61849-7
- Khuroo M.S., Khuroo M.S., Khuroo N.S. Hepatitis E: discovery, global impact, control and cure. *World J. Gastroenterol.*, 2016, vol. 22, no. 31, pp. 7030–7045. doi: 10.3748/wjg.v22.i31.7030
- Kmush B., Wierzbica T., Krain L., Nelson K., Labrique A.B. Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Semin. Liver Dis.*, 2013, vol. 33, no. 1, pp. 15–29. doi: 10.1055/s-0033-1338111
- Kumar A., Beniwal M., Kar P., Sharma J.B., Murthy N.S. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2004, vol. 85, no. 3, pp. 240–244. doi: 10.1016/j.ijgo.2003.11.018
- Pallerla S.R., Harms D., John R., Todt D., Steinmann E., Schemmerer M., Wenzel J.J., Hofmann J., Shih J., Wedemeyer H., Bock C.T., Velavan T.P. Hepatitis E virus infection: circulation, molecular epidemiology, and impact on global health. *Pathogens*, 2020, vol. 9, no. 10: 856. doi: 10.3390/pathogens9100856

15. Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 4: 869. doi: 10.3390/ijms18040869
16. WHO. Hepatitis E. Fact Sheet 21 July 2020. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e> (01.07.2021)
17. Wu X., Chen P., Lin H., Hao X., Liang Z. Hepatitis E virus: current epidemiology and vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2016, vol. 12, no. 10, pp. 2603–2610. doi: 10.1080/21645515.2016.1184806
18. Zhang J., Zhang X.F., Huang S.J., Wu T., Hu Y.M., Wang Z.Z., Wang H., Jiang H.M., Wang Y.J., Yan Q., Guo M., Liu X.H., Li J.X., Yang C.L., Tang Q., Jiang R.J., Pan H.R., Li Y.M., Shih J.W., Ng M.H., Zhu F.C., Xia N.S. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2015, vol. 372, no. 10, pp. 914–922. doi: 10.1056/NEJMoa1406011
19. Zhang J., Zhao Q., Xia N. Prophylactic hepatitis E vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016, vol. 948, pp. 223–246. doi: 10.1007/978-94-024-0942-0\_13
20. Zhu F.C., Zhang J., Zhang X.F., Zhou C., Wang Z.Z., Huang S.J., Wang H., Yang C.L., Jiang H.M., Cai J.P., Wang Y.J., Ai X., Hu Y.M., Tang Q., Yao X., Yan Q., Xian Y.L., Wu T., Li Y.M., Miao J., Ng M.H., Shih J.W., Xia N.S. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2010, vol. 376, no. 9744, pp. 895–902. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61030-6

**Авторы:**

**Личная Е.В.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Фам Т.Х.Ж.**, научный сотрудник института тропической медицины Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-технологического центра, Ханой, Вьетнам;

**Петрова О.А.**, врач клинической лабораторной диагностики центральной клинико-диагностической лаборатории ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Чан Т.Н.**, научный сотрудник института тропической медицины Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-технологического центра, Ханой, Вьетнам;

**Нгуен Т.Т.**, д.н., директор Центра по контролю за инфекционными заболеваниями, Ха Занг, Вьетнам;

**Буй Т.Т.Н.**, научный сотрудник института тропической медицины Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-технологического центра, Ханой, Вьетнам;

**Во В.К.**, к.н., зам. директора Института тропической медицины Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-технологического центра, Ханой, Вьетнам;

**Дмитриев А.В.**, д.б.н., профессор РАН, директор ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Калинина О.В.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Lichnaia E.V.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolution Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Pham T.H.G.**, Researcher, Institute of Tropical Medicine, Joint Russian-Vietnamese Tropical Science and Technology Center, Hanoi, Vietnam;

**Petrova O.A.**, Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Central Clinical and Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Tran T.N.**, Researcher, Institute of Tropical Medicine, Joint Russian-Vietnamese Tropical Science and Technology Center, Hanoi, Vietnam;

**Nguyen T.T.**, MD, PhD, Director of Ha Giang CDC, Ha Giang, Vietnam;

**Bui T.T.N.**, Researcher, Institute of Tropical Medicine, Joint Russian-Vietnamese Tropical Science and Technology Center, Hanoi, Vietnam;

**Vo V.C.**, PhD, Deputy Director of Institute of Tropical Medicine, Joint Russian-Vietnamese Tropical Science and Technology Center, Hanoi, Vietnam;

**Dmitriev A.V.**, PhD, MD (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Director of Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Kalinina O.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Molecular Epidemiology and Evolution Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

# ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ШТАММОВ *HELICOBACTER PYLORI*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РФ

В.М. Сорокин<sup>1</sup>, А.В. Сварваль<sup>2</sup>, А.С. Водопьянов<sup>1</sup>, Р.В. Писанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

<sup>2</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Цель исследования — выявление INDEL-маркеров и изучение географического происхождения региональных штаммов *H. pylori*, циркулирующих в европейской части РФ. В исследование включены 56 штаммов *H. pylori*, выделенные в трех регионах РФ: Санкт-Петербурге, Астраханской и Ростовской области. Геномную ДНК выделяли с использованием набора «Проба НК» (ДНК-Технология, Россия) согласно инструкции производителя. Выявление INDEL-маркеров hr5605, hr6405, hr340, hr1390, hr3660 проводили с помощью ПЦР. Кластеризацию выявленных INDEL-генотипов и построение филогенетического дерева проводили с помощью пакета программ BioNumerics 7.6 и GrapeTree. В качестве референтных штаммов использовали 21 штамм из базы данных GenBank с известным географическим происхождением. У 20 штаммов из Санкт-Петербурга выявлено 13 индивидуальных генотипов, при этом 17 штаммов относятся к европейскому кластеру (hrEurope), 2 штамма к кластеру hspEAsia и один штамм — к кластеру hspWAfrica. Самый распространенный генотип, выявленный в европейском кластере, включает в себя шесть штаммов из Санкт-Петербурга и два штамма из базы данных GenBank. Для дальнейшей дифференциации этих штаммов применен метод VNTR-типирования, позволивший выявить у восьми штаммов восемь индивидуальных генотипов. Пятьдесят шесть изученных российских штаммов представлены тридцатью индивидуальными генотипами, что отражает высокую гетерогенность штаммов, циркулирующих на территории европейской части РФ. Наиболее частый генотип представлен двумя штаммами hrEurope, одним штаммом из Астраханского региона, а также 5 и 6 штаммами из Ростовской области и Санкт-Петербурга соответственно. Подавляющее большинство российских штаммов (52/56) относится к популяции hrEurope, тогда как два штамма из Санкт-Петербурга входят в популяцию hspEAsia и по одному штамму из Санкт-Петербурга и Астраханской области — в популяцию hspWAfrica. Всего 77 штаммов *H. pylori* представлены 37 индивидуальными генотипами с высоким индексом разнообразия (DI = 0,95), что позволяет рассматривать предлагаемый метод INDEL-типирования в качестве самостоятельного для генотипирования штаммов *H. pylori*. Учитывая сложность проблемы точного определения географического происхождения штаммов *H. pylori*, весьма актуальным становится предлагаемый нами простой и удобный метод INDEL-типирования штаммов *H. pylori*, основанный на доступном методе ПЦР и позволяющий проводить адекватный первичный анализ географического происхождения российских штаммов *H. pylori*.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, ПЦР, INDEL, MST-дендрограмма, VNTR-типирование, географическое происхождение.

## Адрес для переписки:

Сварваль Елена Владимировна  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.  
Тел.: 8 911 223-14-11.  
E-mail: alenasvar@rambler.ru

## Contacts:

Alena V. Svarval  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 911 223-14-11.  
E-mail: alenasvar@rambler.ru

## Для цитирования:

Сорокин В.М., Сварваль А.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В.  
Географическое разнообразие штаммов *Helicobacter pylori*,  
циркулирующих в европейской части РФ // Инфекция и иммунитет.  
2021. Т. 11, № 4. С. 701–706. doi: 10.15789/2220-7619-GDO-1590

## Citation:

Sorokin V.M., Svarval A.V., Vodop'janov A.S., Pisanov R.V. Geographical  
diversity of *Helicobacter pylori* strains circulating in the European Part  
of the Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 701–706. doi: 10.15789/2220-  
7619-GDO-1590

## GEOGRAPHICAL DIVERSITY OF *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS CIRCULATING IN THE EUROPEAN PART OF THE RUSSIAN FEDERATION

Sorokin V.M.<sup>a</sup>, Svarval A.V.<sup>b</sup>, Vodop'janov A.S.<sup>a</sup>, Pisanov R.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to identify INDEL markers and study geographical origin of regional *H. pylori* strains circulating in the European part of the Russian Federation. The study included 56 strains of *H. pylori* isolated in three regions of the Russian Federation: Saint Petersburg, Astrakhan and Rostov Regions. Genomic DNA was isolated using a set of Probe NA (DNA Technology, Russia), according to the manufacturer's instructions. Detection of INDEL markers hp5605, hp6405, hp340, hp1390, hp3660 was performed using PCR. Clustering of the identified INDEL genotypes and building a phylogenetic tree were performed using the BioNumerics 7.6 and GrapeTree software packages. 21 strains from the GenBank database with known geographical origin were used as reference strains. In 20 strains from Saint Petersburg, 13 individual genotypes were identified, while 17 strains belong to the European cluster (hpEurope), 2 strains belong to the hspEAsia cluster and one strain belongs to the hspWAfrica cluster. The most common genotype identified in the European cluster includes six strains from Saint Petersburg and two strains from the GenBank database. For further differentiation of these strains, the VNTR typing method was used, which allowed identifying eight individual genotypes in eight strains. Fifty-six studied Russian strains are represented by thirty individual genotypes, which reflects the high heterogeneity of strains circulating in the European part of the Russian Federation. The most frequent genotype is represented by two hpEurope strains, one strain from the Astrakhan region, as well as 5 and 6 strains from the Rostov Region and Saint Petersburg, respectively. The vast majority of Russian strains (52/56) belong to the hpEurope population, while two strains from Saint Petersburg are included in the hspEAsia population, and one strain from Saint Petersburg and the Astrakhan Region is included in the hspWAfrica population. Total, 77 *H. pylori* strains are represented by 37 individual genotypes with a high diversity index (DI = 0.95), which allows us to consider the proposed INDEL typing method as an independent method for genotyping *H. pylori* strains. Taking into consideration the complexity of the problem of accurately determining the geographical origin of *H. pylori* strains, the proposed simple and convenient method of INDEL typing of *H. pylori* strains, based on an available PCR method becomes very relevant and allows us to conduct an adequate primary analysis of the geographical origin of Russian *H. pylori* strains.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, PCR, INDEL, MST dendrogram, VNTR typing, geographical origin.

## Введение

В последние годы различия последовательностей ДНК многих микроорганизмов из различных географических зон мира все чаще связывают с миграцией популяций человека. Бактерия *Helicobacter pylori* как возбудитель гастрита и язвы желудка [18, 19] является одним из уникальных кандидатов для реконструкции миграции древнего человека. *H. pylori* обычно приобретает в раннем детстве, и после этого бактериальная колонизация часто продолжается в течение большей части жизни хозяина. Изначально было показано, что доминирующим фактором является внутрисемейная передача от родителей к детям [15, 30], однако позже была доказана частая горизонтальная передача инфекции между людьми, проживающими на одной территории [5]. Рекомбинация между неродственными штаммами происходит во время смешанной колонизации [8, 14, 22, 29], что приводит к многочисленным изменениям в бактериальном геноме. Необычно высокая частота мутаций [4, 7, 24] и скорость рекомбинации [8, 28] определяют разнообразие последовательностей ДНК *H. pylori*, которое намного больше, чем у других бактерий. Как следствие, штаммы *H. pylori* очень разнообразны и почти каждый изолят обладает уникальным типом последова-

тельств ДНК в схеме мультилокусного сиквенс-типирования (Multilocus Sequence Typing — MLST) последовательностей ДНК семи генов жизнеобеспечения *H. pylori* [9, 17]. Это необычно высокое разнообразие последовательностей привело к первоначальному предположению, что популяционная структура *H. pylori* является панмиктической [10, 23]. Генетическое разнообразие *H. pylori* было подтверждено, помимо метода MLST, и с помощью других методических подходов [3, 11, 12, 13, 25, 27].

В 2003 г. Falush и соавт. [9] при анализе 370 штаммов *H. pylori* методом MLST-типирования выделили четыре группы штаммов с различным географическим происхождением: hpEurope, hpAfrica 1 (позже разделенная на hspWAfrica и hspSAfrica), hpAfrica 2 и hpEastAsia (состоящая из hspAmerind, hspEAsia и hspMaori). Позднее было проведено MLST-типирование расширенного набора 769 изолятов *H. pylori*, выделенных у представителей 51 различной этнической группы населения всего мира [17, 20]. Было определено шесть основных бактериальных популяций, обозначенных по географическим регионам, в которых они выделялись наиболее часто. Пять из шести популяций оказались очень тесно связанными друг с другом, и к ним относились hpEurope, изолированные от европейцев, а также из стран Ближнего Востока

и из Индии [1, 6, 9, 17]; hpAfrica1 из Марокко, Сенегала, Буркина-Фасо и Южной Африки; hpNEAfrica, изолированный в Эфиопии, Сомали, Судане и в Северной Нигерии; hpAsia2, обнаруженный преимущественно в Северной Индии, а также в изолятах из Бангладеш, Таиланда и Филиппин; и hpEastAsia — из континентальной Восточной Азии, Океании и Америки. Далее внутрорегиональная кластеризация разделяет популяцию hpAfrica1 на западную (hspWAfrica) и южную (hspSAfrica) субпопуляции, а также hpEastAsia на материковую восточноазиатскую (hspEAsia), океаническую (hspMaori) и аборигенную американскую (hspAmerind) субпопуляции [9, 17]. Была также определена шестая и более отдаленно связанная популяция, hpAfrica2, которая не только сильно отличается от всех других популяций *H. pylori*, но и обнаружена только в Южной Африке, у людей как с африканским, так и европейским происхождением. Происхождение hpAfrica2 до сих пор остается неясным. И, наконец, в Новой Гвинее и Австралии обнаружена новая седьмая популяция *H. pylori* — hpSahul [21].

До настоящего времени MLST-типирование остается наиболее используемым методом для определения географического происхождения штаммов *H. pylori*, тем не менее он не лишен некоторых недостатков. Метод включает в себя секвенирование семи амплифицированных фрагментов ДНК общим размером 3850 нуклеотидов с дальнейшим определением однонуклеотидных замен (SNP) в последовательностях ДНК размером более 1400 нуклеотидов для каждого штамма и, следовательно, требует применения дорогостоящего высокотехнологического оборудования и сложного программного обеспечения.

Нами недавно предложен способ дифференциации штаммов *Helicobacter pylori*, основанный на INDEL-типировании [2], и проведено исследование региональных клинических изолятов *H. pylori* для первичного анализа их географического происхождения [27].

Цель исследования — выявление INDEL-маркеров и изучение географического происхождения региональных штаммов *H. pylori*, циркулирующих в европейской части Российской Федерации.

## Материалы и методы

В исследование включены 56 штаммов *H. pylori*, выделенные в трех регионах РФ: Санкт-Петербурге, Астраханской и Ростовской области. Геномную ДНК выделяли с использованием набора «Проба НК» (ДНК-Технология, Россия), согласно инструкции производителя. Выявление INDEL-маркеров проводили с помощью ПЦР,

как описано ранее [27]. Кластеризацию выявленных INDEL-генотипов и построение филогенетического дерева проводили с помощью пакета программ BioNumerics 7.6 и GrapeTree [33]. В качестве референтных штаммов использовали 21 штамм из базы данных GenBank с известным географическим происхождением. VNTR-генотипирование проводили с помощью ПЦР, как описано ранее [25, 26]. Исследование одобрено независимым локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 50/04-2019, 22.06.2020).

## Результаты

Методом ПЦР проведено выявление пяти INDEL-маркеров в ДНК 20 штаммов *H. pylori*, выделенных в Санкт-Петербурге (табл.).

Проведена кластеризация выявленных INDEL-генотипов и построено филогенетическое дерево методом MST (minimal spanning tree) с помощью пакета программ BioNumerics 7.6 (рис. 1, II обложка).

У 20 штаммов из Санкт-Петербурга выявлено 13 индивидуальных генотипов, при этом 17 штаммов относятся к европейскому кластеру (hpEurope), 2 штамма к кластеру hspEAsia (SP980,

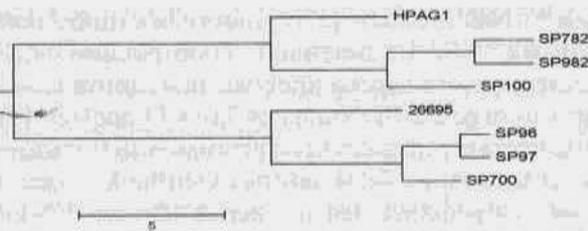
**Таблица. Распределение INDEL-маркеров в геноме 20 штаммов *H. pylori***

Table. Distribution of INDEL markers in genome of 20 *H. pylori* strains

Штамм Strain	hp5605	hp6405	hp340	hp1390	hp3660
SP100	102*	100	79	76	96
SP98	0	100	0	0	0
SP97	102	100	79	76	96
SP96	102	100	79	76	96
SP95	102	100	79	76	0
SP1002	102	106	79	64	96
SP984	0	100	79	0	96
SP983	102	106	79	76	96
SP982	102	100	79	76	96
SP700	102	100	79	76	96
SP707	102	106	79	76	0
SP755	102	106	79	76	96
SP782	102	100	79	76	96
SP786	0	100	79	0	0
SP956	102	100	79	76	0
SP958	102	106	79	0	0
SP967	102	100	79	0	96
SP980	0	100	79	64	108
SP981	102	106	85	64	96
SP994	102	100	79	64	108

**Примечание.** \* — размер ампликона в п.н., 0 — отсутствие ампликона.

Note. \* — amplified fragment in bp, 0 — absence of amplified fragment.



**Рисунок 2. Дендрограмма VNTR-генотипов 8 штаммов *H. pylori* из кластера hpEurope**

Figure 2. Dendrogram of VNTR genotypes of 8 strains from the hpEurope cluster

SP994) и один штамм — к кластеру hspWAfrica (SP981). Самый распространенный генотип, выявленный в европейском кластере, включает в себя шесть штаммов из Санкт-Петербурга и два штамма из базы данных GenBank. Для дальнейшей дифференциации этих штаммов применен метод VNTR-типирования, описанный нами ранее [25, 26] (рис. 2).

Таким образом, дополнительное применение метода VNTR-типирования позволяет выделить из штаммов с общим INDEL-генотипом индивидуальные VNTR-генотипы.

Для верификации результатов, полученных методом MST, нами был использован другой алгоритм кластеризации, а именно метод «ближайших соседей» (NJ), наиболее часто применяемый в процедуре MLST и реализованный в программе GrapeTree [33] (рис. 3, II обложка).

Состав кластеров практически не изменился, за исключением попадания в группу hspEAsia еще одного штамма из Санкт-Петербурга (SP98). Таким образом, подтверждается возможность применения метода INDEL-типирования для определения географического происхождения российских штаммов *H. pylori*.

Для расширения географического состава штаммов в исследование были добавлены 15 штаммов *H. pylori*, выделенных в Ростовской области, и 21 штамм с ранее определенными INDEL-генотипами из Астраханской области [27]. Таким образом, в процедуру построения филогенетического дерева методом MST включены 77 штаммов *H. pylori*, из них 56 российских (рис. 4, II обложка).

Как видно из рис. 4, 30 из 56 российских штаммов *H. pylori*, выделенных на территории европейской части РФ, представлены индивидуальными генотипами, что отражает высокую гетерогенность штаммов. Наиболее частый генотип представлен двумя штаммами hpEurope, одним штаммом из Астраханского региона, а также 5 и 6 штаммами из Ростовской области и Санкт-Петербурга соответственно. Подавляющее большинство российских штаммов (52/56) относится к популяции hpEurope, тогда как два штамма из Санкт-Петербурга вхо-

дят в популяцию hspEAsia и по одному штамму из Санкт-Петербурга и Астраханской области — в популяцию hspWAfrica. Один референтный штамм, hspEAsia F32, неожиданно оказывается в популяции hpEurope. Всего 77 штаммов *H. pylori* представлены 37 индивидуальными генотипами с высоким индексом разнообразия ( $DI = 0,95$ ), что позволяет рассматривать предлагаемый метод INDEL-типирования в качестве самостоятельного для генотипирования штаммов *H. pylori*.

## Обсуждение

Внедрение в широкую практику методов полногеномного секвенирования (WGS) позволило разработать новые подходы для дифференциации штаммов *H. pylori* и определения их географического происхождения. Tsang A.K.L. и соавт. [31] провели полногеномное секвенирование штаммов бактерий десяти видов, включая *H. pylori*, и доказали, что MLST-типирование не способно полностью отразить геномную филогению потому, что семь используемых для MLST генов содержат всего около 0,5% информации полного генома. Кроме того, MLST не способен учитывать события рекомбинации во всем геноме. Таким образом, WGS- и SNP-типирование полного генома гораздо более эффективны для изучения филогенетических связей между штаммами разных видов бактерий. На основе метода NGS (next generation sequencing) были изучены последовательности двух профагов в геноме *H. pylori*, выявлены филогеографические связи между штаммами, и впервые было показано, что европейская популяция *H. pylori* (hpEurope) разделяется на две различные популяции (hpNEurope и hpSWEurope) [32], и это подтверждается и нашими данными INDEL-типирования (рис. 4). Следует отметить, что штамм India7, относящийся по классификации MLST к hpAsia2, по фаговому типированию входит в популяцию hpEurope, что соответствует результатам INDEL-типирования (данные не приведены). Примечательно, что российские штаммы наряду с общими генотипами с европейскими штаммами (6 генотипов), обладают гораздо большим количеством индивидуальных генотипов (17 генотипов), что подтверждает высокую гетерогенность штаммов, циркулирующих на территории европейской части РФ. Наконец, недавно предложен новый метод отбора таксонов, который направлен на минимизацию проблем дифференциации видов бактерий с высокой частотой рекомбинации, таких как *H. pylori* [16]. Авторы исследовали 185 штаммов *H. pylori*, из них 177 было секвенировано, а информация о 8 референтных штаммах была взята из литературных

источников. MLST-типирование обычно выявляет большое количество смешанных популяций, например hrEurope с hrNEAfrica, hrEurope с hrAsia2 и т. д., обусловленное высокой частотой событий рекомбинации. В итоге из 185 штаммов было отобрано только 16, характеризующихся минимальной частотой рекомбинантных событий и обозначенных как quintessents («основные»). В частности, из 89 штаммов hrEurope было выбрано как quintessents только 16, что связано с длительной миграцией человека через Европу и, следовательно, большим количеством рекомбинантных событий. Также оба штамма hrAsia2 (один из них India7) не смогли сформировать отдельную субпопуляцию. Таким образом, пять из восьми референтных штаммов не были включены в категорию quintessents. Данная «очистка» позволила создать структуру из 7 «чистых» популяций, не перекрещивающихся друг с другом. Приведенные данные позволяют объяснить такие факты, как попадание в популяцию hrEurope штамма F32

(рис. 4), а также штамма India7. Таким образом, проблема точного определения географического происхождения штаммов окончательно не решена из-за наличия большого количества «гибридных» штаммов, а новые способы ее решения требуют применения дорогостоящего высокотехнологического оборудования и сложного программного обеспечения.

На этом фоне весьма актуальным становится предлагаемый нами простой и удобный метод INDEL-типирования штаммов *H. pylori*, основанный на доступном методе ПЦР, позволяющий проводить адекватный первичный анализ географического происхождения штаммов *H. pylori*. Проведенный с помощью метода INDEL-типирования филогенетический анализ российских штаммов *H. pylori* позволил определить гетерогенность структуры популяции, в которой, помимо преобладающих штаммов европейской (hrEurope) группы, были впервые на территории РФ выявлены штаммы популяций hspEAsia и hspWAfrica.

## Список литературы/References

1. Момыналиев К.Т., Челышева В.В., Акопиан Т.А., Селезнева О.В., Линц Б., Ахтман М., Говорун В.М. Популяционная идентификация российских изолятов *Helicobacter pylori* // Генетика. 2005. Т. 41, № 10. С. 1434–1437. [Momynaliev K.T., Chelysheva V.V., Akopian T.A., Selezneva O.V., Lints B., Akhtman M., Govorun V.M. Population identification of Russian *Helicobacter pylori* isolates. *Genetika = Genetics*, 2005, vol. 41, no. 10, pp. 1434–1437. (In Russ.)]
2. Патент RU 2688434C1. Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01), C12N 15/10 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), A61K 39/02 (2006.01). Способ дифференциации штаммов *Helicobacter pylori* путем молекулярно-генетического типирования: № 2011154058/10; заявлено 28.12.2011; опубликовано: 20.05.2013 / Сорокин В.М., Писанов Р.В. Патентообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 7 с. [Patent No. 2688434C1 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01), C12N 15/10 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), A61K 39/02 (2006.01). Method for differentiation of strains *Helicobacter pylori* by multilocus VNTR-typing: No. 2011154058/10; application: 2011.12.28; date of publication 2013.05.20 / Sorokin V.M., Pisanov R.V. Proprietors: Federal'noe kazennoe uchrezhdenie zdravookhraneniya "Rostovskij-na-Donu ordena Trudovogo Krasnogo Znameni nauchnoissledovatel'skij protivochumnyj institut" Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka. 7 p.]
3. Achtman M., Azuma T., Berg D.E., Ito Y., Morelli G., Pan Z.J., Suerbaum S., Thompson S.A., van der Ende A., van Doorn L.J. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 32, pp. 459–470. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01382.x
4. Björkholm B., Sjölund M., Falk P.G., Berg O.G., Engstrand L., Andersson D.I. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, pp. 14607–14612. doi: 10.1073/pnas.241517298
5. Delport W., Cunningham M., Olivier B., Preisig O., Van Der Merwe S.W. A population genetics pedigree perspective on the transmission of *Helicobacter pylori*. *Genetics*, 2006, vol. 174, pp. 2107–2118. doi: 10.1534/genetics.106.057703
6. Devi S.M., Ahmed I., Francalacci P., Hussain M.A., Akhter Y., Alvi A., Sechi L.A., Mégraud F., Ahmed N. Ancestral European roots of *Helicobacter pylori* in India. *BMC genomics*, 2007, vol. 8, no. 1: 184. doi: 10.1186/1471-2164-8-184
7. Eppinger M., Baar C., Linz B., Raddatz G., Lanz C., Keller H., Morelli G., Gressmann H., Achtman M., Schuster S.C. Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genet.*, 2006, vol. 2, no. 7: e120. doi: 10.1371/journal.pgen.0020120.eor
8. Falush D., Kraft C., Taylor N.S., Correa P., Fox J.G., Achtman M., Suerbaum S. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, no. 26, pp. 15056–15061. doi: 10.1073/pnas.251396098
9. Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard J.K., Stephens M., Kidd M., Blaser M.J., Graham D.Y., Vacher S., Perez-Perez G.I., Yamaoka Y. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 2003, vol. 299, no. 5612, pp. 1582–1585. doi: 10.1126/science.1080857
10. Go M.F., Kapur V., Graham D.Y., Musser J.M. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, pp. 3934–3938. doi: 10.1128/jb.178.13.3934-3938.1996
11. Guo C., Liao Y., Li Y., Duan J., Guo Y., Wu Y., Cui Y. Genotyping analysis of *Helicobacter pylori* using multiple locus variable-number tandem-repeats analysis in five regions of China and Japan. *BMC Microbiol.*, 2011, vol. 11: 197. doi: 10.1186/1471-2180-11-197
12. Han S.R., Zschausch H.C., Meyer H.G., Schneider T., Loos M., Bhakdi S., Mauerer M.J. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, pp. 3646–3651. doi: 10.1128/JCM.38.10.3646-3651.2000

13. Kang J., Blaser M.J. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, vol. 4, pp. 826–836. doi: 10.1038/nrmicro1528
14. Kersulyte D., Chalkauskas H., Berg D.E. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 31, pp. 31–43. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01140.x
15. Kivi M., Tindberg Y., Sörberg M., Casswall T.H., Befrits R., Hellström P.M., Bengtsson C., Engstrand L., Granström M. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 12, pp. 5604–5608. doi: 10.1128/JCM.41.12.5604-5608.2003
16. Lamichhane B., Wise M.J., Chua E.G., Marshall B.J., Tay C.Y. A novel taxon selection method, aimed at minimizing recombination, clarifies the discovery of a new sub-population of *Helicobacter pylori* from Australia. *Evol. Appl.*, 2020, vol. 13, no. 2, pp. 278–289. doi: 10.1111/eva.12864
17. Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe S.W., Yamaoka Y. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 2007, vol. 445, no. 7130, pp. 915–918. doi: 10.1038/nature05562
18. Marshall B.J., Armstrong J.A., McGeachie D.B., Glancy R.J. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.*, 1985, vol. 142, pp. 436–439.
19. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984, vol. 1, pp. 1311–1315. doi: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6
20. Moodley Y., Linz B. *Helicobacter pylori* sequences reflect past human migrations. *Genome Dyn.*, 2009, vol. 6, pp. 62–74. doi: 10.1159/000235763
21. Moodley Y., Linz B., Yamaoka Y., Windsor H.M., Breurec S., Wu J.Y., Maady A., Bernhöft S., Thiberge J.M., Phuanukoonnon S., Jobb G. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science*, 2009, vol. 323, no. 5913, pp. 527–530. doi: 10.1126/science.1166083
22. Raymond J., Thiberge J.M., Chevalier C., Kalach N., Bergeret M., Labigne A., Dauga C. Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, vol. 10, no. 10, pp. 1816–1821. doi: 10.3201/eid1010.040042
23. Salaun L., Audibert C., Le Lay G., Burucoa C., Fauchere J.L., Picard B. Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, vol. 161, pp. 231–239. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12953.x
24. Schuster S.C., Wittekindt N.E., Linz B. Molecular mechanisms of host-adaptation in *Helicobacter*. In: *Helicobacter pylori: molecular genetics and cellular biology*. Ed. by Yamaoka Y. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2008, pp. 193–204.
25. Sorokin V., Pisanov R., Golubkina E., Bereznyak E., Prozorova L. Comparative multiple-locus variablenumber tandem repeat analysis of *Helicobacter pylori* isolates from South of Russia. *IJMB*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 135–138. doi: 10.11648/ijmb.20170203.15
26. Sorokin V.M., Pisanov R.V., Vodop'janov A.S. Improvement of multiple-locus VNTR analysis typing scheme for *Helicobacter pylori*. *Asian J. Biochem. Genet. Mol. Biol.*, 2018, vol. 1, no. 4, pp. 1–7.
27. Sorokin V.M., Pisanov R.V., Vodop'janov A.S., Golubkina E.V. New tool for phylogenetic analysis of *Helicobacter pylori*. *WJARR*, 2020, vol. 6, no. 2, pp. 60–67. doi: 10.30574/wjarr.2020.6.2.0128
28. Suerbaum S., Smith J.M., Bapumia K., Morelli G., Smith N.H., Kunstmann E., Dyrek I., Achtman M. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, no. 21, pp. 12619–12624. doi: 10.1073/pnas.95.21.12619
29. Taylor N.S., Fox J.G., Akopyants N.S., Berg D.E., Thompson N., Shames B., Yan L., Fontham E., Janney F., Hunter F.M. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, no. 4, pp. 918–923. doi: 10.1128/JCM.33.4.918-923.1995
30. Tindberg Y., Bengtsson C., Granath F., Blennow M., Nyren O., Granstrom M. *Helicobacter pylori* infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. *Gastroenterology*, 2001, vol. 121, pp. 310–316. doi: 10.1053/gast.2001.26282
31. Tsang A.K.L., Lee H.H., Yiu S.M., Lau S.K., Woo P.C. Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1: 4536. doi: 10.1038/s41598-017-04707-4
32. Vale F.F., Nunes A., Oleastro M., Gomes J.P., Sampaio D.A., Rocha R., Vitor J.M., Engstrand L., Pascoe B., Berthenet E., Sheppard S.K. Genomic structure and insertion sites of *Helicobacter pylori* prophages from various geographical origins. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7: 42471. doi: 10.1038/srep42471
33. Zhou Z., Alikhan N.F., Sergeant M.J., Luhmann N., Vaz C., Francisco A.P., Carriço J.A., Achtman M. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.*, 2018, vol. 28, no. 9, pp. 1395–1404. doi: 10.1101/gr.232397.117

**Авторы:**

**Сорокин В.М.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории туляремии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия;

**Сварваль А.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Водоп'янов А.С.**, к.м.н., зав. группой вирусологии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия;

**Писанов Р.В.**, к.б.н., зав. лабораторией диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, г. Ростов-на-Дону, Россия.

**Authors:**

**Sorokin V.M.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Tularemia Laboratory, Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, Russian Federation;

**Svarval A.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Pathogen Identification, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vodop'janov A.S.**, PhD (Medicine), Head of the Virology Group, Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, Russian Federation;

**Pisanov R.V.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory for Diagnostics of Especially Dangerous Infections, Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.08.2020  
Отправлена на доработку 25.02.2021  
Принята к печати 18.03.2021

Received 24.08.2020  
Revision received 25.02.2021  
Accepted 18.03.2021

# РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА КЛЕЩЕВОГО ВИРУСНОГО ЭНЦЕФАЛИТА И КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ

Б.Р. Гнатив<sup>1</sup>, Н.К. Токаревич<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Управление Роспотребнадзора по Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия

<sup>2</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Целью данной работы является анализ результатов комплексных эпидемиологических и зоолого-энтомологических исследований для определения эколого-эпидемиологических особенностей очагов клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) и клещевого боррелиоза (КБ), а также роли антропогенных факторов в их эпидемическом проявлении для совершенствования противозидемических мероприятий. Проанализированы многолетние данные о показателях обилия клещей, собранных на флаг, в разных районах Республики Коми (РК). С помощью иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции определена инфицированность вирусом клещевого энцефалита и *Borrelia burgdorferi* клещей, собранных с растительности, людей и домашних животных в разных районах РК. Проанализированы данные о количестве жителей РК, пострадавших от нападения клещей с 1994 по 2017 г., о заболеваемости КВЭ с 1970 по 2017 г. и КБ с 1997 по 2017 г., о влиянии трансформации лесов на заболеваемость КВЭ. Отмечен существенный рост численности клещей в 2006–2017 гг. в южных районах РК и экспансия этих кровососущих на север. Также показано, что территория РК, на которой регистрировались случаи нападения клещей на людей, значительно расширилась. Средние показатели покусанности клещами выросли в 2006–2017 гг. по сравнению с 1994–2005 гг. более чем в 4 раза. В районах, где вырубка лесов идет наиболее активно, увеличилось количество жителей, пострадавших от присасывания клещей, и был зарегистрирован выраженный подъем заболеваемости КВЭ. В последние годы выявлено увеличение инфицированности клещей вирусом клещевого энцефалита, как собранных с растительности, так и с пострадавших людей и животных. Среднегодовые показатели заболеваемости КВЭ в 2006–2017 гг. по сравнению с 1970–1981 гг. и 1982–1993 гг. увеличились в 11 и 36 раз соответственно. В последние годы стали регистрироваться наиболее тяжелые очаговые формы болезни. В период с 1996 по 2017 г. летальность при КВЭ составила 2,3%. Основные черты эпидемиологии КБ сходны с таковыми при КВЭ. Так, доля инфицированности собранных с травы клещей *Borrelia burgdorferi* увеличилась с 9,5% в 2010 г. до 34,7% в 2017 г. Отмечен резкий подъем заболеваемости и значительное расширение территорий распространения заболеваний на север, где эта инфекция стала регистрироваться лишь в последние годы. КБ и КВЭ имеют выраженный профессиональный характер. Аргументирована необходимость проведения адресной профилактики клещевых инфекций с учетом местных особенностей. Северные территории РК, на которых в последние годы были зарегистрированы случаи нападения клещей на жителей, следует рассматривать в качестве потенциально эндемичных.

**Ключевые слова:** клещевой вирусный энцефалит, клещевой боррелиоз, экология, трансформация лесов, эпидемиология, профессиональные риски, обилие клещей, заболеваемость, летальность, профилактика, Европейский Север.

## Адрес для переписки:

Гнатив Богдан Романович  
167000, Россия, Республика Коми, г. Сыктывкар,  
ул. Димитрова, 1-А, ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии  
в Республике Коми.  
Тел.: 8 (212) 20-36-96, 8 904 270-36-36 (моб.).  
E-mail: Gnativ\_BR@mail.ru

## Contacts:

Bogdan R. Gnativ  
167000, Russian Federation, Republic of Komi, Syktvykar,  
Dimitrova str., 1-A, Center of Hygiene and Epidemiology  
in the Republic of Komi.  
Phone: +7 (212) 20-36-96, +7 904 270-36-36 (mobile).  
E-mail: Gnativ\_BR@mail.ru

## Для цитирования:

Гнатив Б.Р., Токаревич Н.К. Результаты многолетнего мониторинга клещевого вирусного энцефалита и клещевого боррелиоза в Республике Коми // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 707–722. doi: 10.15789/2220-7619-ROL-1299

## Citation:

Gnativ B.R., Tokarevich N.K. Long-term monitoring of tick-borne viral encephalitis and tick-borne borreliosis in the Komi Republic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 707–722. doi: 10.15789/2220-7619-ROL-1299

## LONG-TERM MONITORING OF TICK-BORNE VIRAL ENCEPHALITIS AND TICK-BORNE BORRELIOSIS IN THE KOMI REPUBLIC

Gnativ B.R.<sup>a</sup>, Tokarevich N.K.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Rosпотребнадзор Office for the Republic of Komi, Syktyvkar, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Our study was aimed at analyzing data combining objective epidemiological, zoological and entomological research intended to determine the environmental and epidemiological patterns of tick-borne encephalitis (TBE) and Lyme borreliosis (LB) foci, as well as the role of anthropogenic factors in epidemic manifestations to improve anti-epidemic activities. Long-term data on the abundance of ticks flagged from vegetation in various districts of the Komi Republic (RK) have been analyzed. The prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) and *Borrelia burgdorferi* (agent of LB) in ticks picked from vegetation, humans and domestic animals in various districts of the RK was measured by using enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction (PCR-ELISA). In addition, the data on 1994–2017 tick-bite incidence in RK, 1970–2017 TBE incidence, and 1997–2017 LB incidence were also examined and correlated with the impact of forest transformation on the TBE incidence. The rise of tick population in the southern districts of RK and its northward expansion were noted. It is also shown that the RK territory, where tick bites are registered, expanded significantly. Mean annual tick-bite incidence rate in 2006–2017 vs. 1994–2005 timeframe was increased by 4-fold. RK regions where deforestation took place, the tick-bite incidence was increased, and the local TBE incidence elevated distinctly. In recent years, there was a rise in TBEV prevalence in ticks, collected either from vegetation or from humans and animals. In 2006–2017 and 1970–1981, mean annual TBE incidence rate increased by a 11- and 36-fold as compared to that one registered in 1982–1993. In recent years, the most severe focal TBE forms began to be recorded. In 1996–2017, the TBE mortality rate was 2.3%. The main features of LB epidemiology mimic those found in TBEV. In particular, the prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks flagged from vegetation increased from 9.5% to 34.7% in 2010 vs. 2017, respectively. A sharp rise in LB incidence rate and profound northward shift for bacterial range, where this infection started to be registered only in recent years, were noted. Both TBE and LB demonstrated marked occupation-related pattern. The need in conducting task-oriented prophylaxis of tick-borne infections is necessitated by taking into account geographic specifics. The RK northern regions should be considered as potentially endemic, where tick bites in human population has recently begun to be reported.

**Key words:** tick-borne viral encephalitis, tick-borne borreliosis, ecology, forest transformation, epidemiology, occupational risks, tick abundance, morbidity, mortality, prevention, the European North.

## Введение

Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, такие как клещевой вирусный энцефалит (далее — КВЭ) и клещевой боррелиоз (далее — КБ) и их микст-формы, представляют серьезную проблему для здравоохранения. Их медицинское и социальное значение возрастает, что связано с регистрацией этих инфекций на «новых» территориях, где ранее они не выявлялись. Число субъектов Российской Федерации (далее — РФ) с наличием эндемичных по КВЭ территорий в 1956 г. составляло 37, в 2017 г. случаи КВЭ были зарегистрированы уже на территории 65 субъектов РФ, при этом в 14 субъектах РФ заболевание закончилось летальным исходом у 28 больных [12]. Особенно выражено расширение территорий, эндемичных по КВЭ, на Европейском Севере России, что в значительной степени связано с глобальным изменением климата [24, 36, 37, 38]. Наряду с климатическими факторами, обуславливающими экспансию клещей на новые территории и, как следствие, распространение на них «клещевых» инфекций, вероятно, и антропогенные факторы могут влиять на численность клещей в преде-

лах конкретных местностей и тем самым влиять на пространственную структуру природных очагов КВЭ и заболеваемость этой инфекцией.

Распространение и эпидемиология КВЭ и КБ существенно не различаются. Официальная регистрация КБ в Республике Коми (далее — РК) началась сравнительно недавно, с 1997 г., поэтому эта инфекция в настоящее время менее изучена, чем КВЭ.

Цель данной работы — анализ результатов комплексных эпидемиологических и зоолого-эпидемиологических исследований для определения эколого-эпидемиологических особенностей очагов КВЭ и КБ на территории РК и роли антропогенных факторов в их эпидемическом проявлении с целью совершенствования противозаразных мероприятий.

**Географические и демографические данные.** РК расположена на крайнем северо-востоке европейской части РФ в пределах Печорской и Мезенско-Вычегодской низменностей, Среднего и Южного Тимана, западных склонов Уральских гор (Северный, Приполярный и Полярный Урал). Занимает 416,8 тыс. кв. км (2,4% площади РФ). Протяженность РК с юго-запада на северо-восток составляет 1275 км.

Граничит с Ненецким автономным округом (север, северо-запад), Архангельской областью (запад), Ямало-Ненецким автономным округом (восток), Ханты-Мансийским автономным округом (восток), Свердловской областью (восток), Пермским краем (юго-восток), Кировской областью (юг, юго-запад).

Столица — город Сыктывкар. РК делится на следующие административно-территориальные единицы: 8 городов республиканского значения с подчиненными им территориями (Сыктывкар, Воркута, Инта, Усинск, Печора, Ухта, Сосногорск, Вуктыл) и 12 муниципальных районов (Усть-Цилемский, Ижемский, Троицко-Печорский, Удорский, Княжпогостский, Усть-Вымский, Усть-Куломский, Корткеросский, Сыктывдинский, Сысольский, Койгородский, Прилузский).

На большей части территории РК климат умеренно континентальный с продолжительной зимой и коротким летом, прохладным на севере и теплым на юге.

Население РК на 01.01.2017 составляло 850,5 тыс. человек, включая коренное население коми (22%), а также коренные малочисленные народы РФ: ненцы, ханты, манси. Городское население в РК составляет 78%. Группы профессионального риска в отношении клещевых инфекций составляют около 0,3% от жителей РК. Плотность населения довольно низкая, составляет 2,04 человека на 1 кв. км. Количество жителей за последние 48 лет (1970–2017 гг.) уменьшилось на 11,8%.

Поскольку в большинстве случаев жители города Сыктывкара заражаются КВЭ и КБ в Сыктывдинском районе, в данной работе эти административно-территориальные единицы были объединены. Для достижения целей настоящего исследования все административно-территориальные единицы РК были разделены нами на четыре зоны в зависимости от физико-географических районов: полярная зона (Р) — в границах полярно-тундровой и лесотундровой подзон; северная зона (N) — в границах северной тайги, центральная зона (С) — в границах средней тайги, южная зона (S) — в границах южной тайги (рис. 1).

## Материалы и методы

**Эпидемиологические данные.** Для оценки эпидемиологической ситуации в РК по КВЭ и КБ проанализирована следующая информация.

Данные о ежемесячных показателях обилия клещей, собранных в S1, S2, S3, S4, S6, S7 на флаг за один час, рассчитаны на основании результатов сбора голодных клещей с растительности на флаг ежемесячно в период их наибольшей активности с мая по июль в 1970–1971,

1974–1980, 1982–1984, 1986–1987, 1989–1992, 2000, 2002–2003, 2005–2017 гг. Вид клещей определяли по стандартной методике [27].

Инфицированность клещей вирусом клещевого энцефалита в 2000–2017 гг. определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита (производство ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Инфицированность клещей *Borrelia burgdorferi* в 2010–2016 гг. определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью набора реагентов для выявления РНК *B. burgdorferi sensu lato* в биологическом материале, а с 2017 г. — с помощью набора реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся клещами *TBEV*, *B. burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis/Ehrlichia muris* в биологическом материале (оба набора производства ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

**Количество жителей РК, обратившихся за медицинской помощью из-за укуса клещами в 1994–2017 гг.** Соответствующая первичная информация с указанием даты и места укуса (района РК) поступала из лечебно-профилактических организаций во ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Коми и его территориально обособленные подразделения. Из этих данных рассчитан показатель «покусанности» клещами (далее — ППК), то есть количество жителей, пострадавших от нападения клещей в течение года, на 100 тыс. населения, проживающего на данной территории.

Показатели заболеваемости КВЭ (ПЗ-КВЭ) — количество случаев КВЭ в течение года на 100 тыс. населения, проживающего на данной территории, были проанализированы за период с 1970 по 2017 г.

Показатели заболеваемости КБ (ПЗ-КБ) — количество случаев КБ в течение года на 100 тыс. населения, проживающего на данной территории, были проанализированы за период с 1997 по 2017 г.

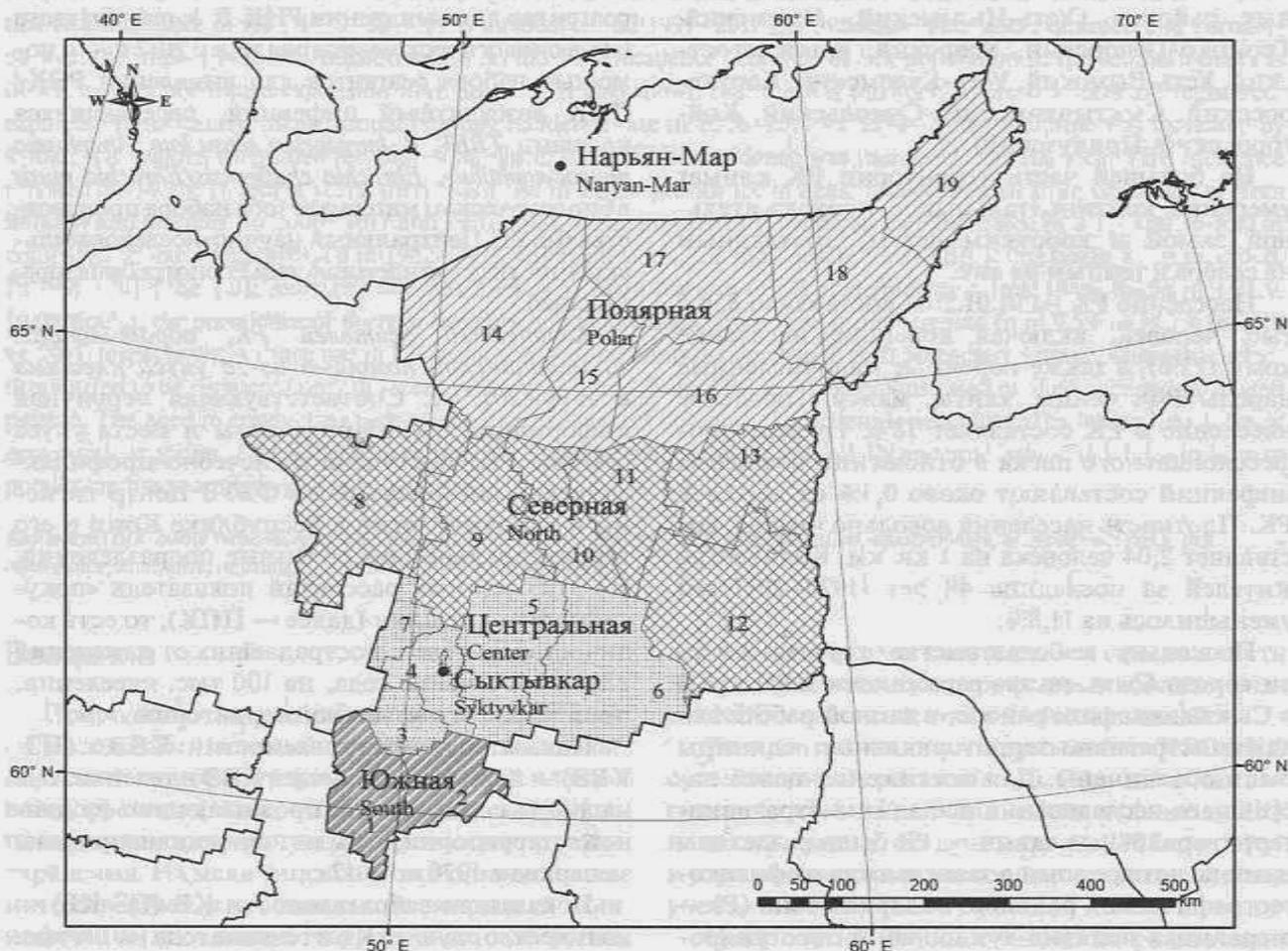
Проанализированы данные карт эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания: 190 карт, составленных за период 1996–2017 гг. в очагах КВЭ, и 105 карт, составленных за период 1997–2017 гг. в очагах КБ. Диагноз КВЭ и КБ ставили на основании клинико-эпидемиологических данных и, как правило, подтверждали результатами серологических методов исследования (в 97,4 и 61,9% случаев соответственно) при исследовании парных сывороток в динамике инфекционного процесса с сертифицированными диагностическими препаратами.

В настоящей работе проанализированы только те случаи укусов клещей и заражения КВЭ и КБ, которые имели место на территории РК. Критерием являлись показания пациентов о том, что за месяц до начала заболевания они не выезжали за пределы района проживания.

**Экологические данные.** Общая площадь лесов в РК на 01.01.2017 составляет 93,6% территории региона. Остальные 6,4% находятся в зоне тундры. Величина лесистости в отдельных районах республики различна и зависит от физико-географических, климатических и почвенных

условий. Средняя лесистость в РК составляет 79,1%. С 2013 г. наблюдается тенденция к снижению коэффициента смены пород, что связано с ежегодным увеличением площадей хвойных пород, переведенных в покрытую лесом площадь. В настоящее время на покрытых лесом площадях доля молодняка составляет 12,5%, средневозрастных — 18,8%, приспевающих — 5,5%, спелых — 23,1%, перестойных — 40,1%.

При проведении анализа соотношения площадей лесов разного возраста было установлено, что по сравнению с 1998 г. в 2013 г. площа-



**Рисунок 1. Разделение административно-территориальных единиц Республики Коми по физико-географическим зонам**

Figure 1. Division of administrative-territorial units of the Republic of Komi by physical-geographical zones

**Примечание.** Районы, входящие в южную зону: 1 — Прилузский район (S1), 2 — Койгородский район (S2); районы, входящие в центральную зону: 3 — Сысольский район (C3), 4 — город Сыктывкар и Сыктывдинский район (C4), 5 — Корткеросский район (C5), 6 — Усть-Куломский район (C6), 7 — Усть-Вымский район (C7); районы, входящие в северную зону: 8 — Удорский район (N8), 9 — Княжпогостский район (N9), 10 — Ухтинский район (N10), 11 — Сосногорский район (N11), 12 — Троицко-Печорский район (N12), 13 — Вуктыльский район (N13); районы, входящие в полярную зону: 14 — Усть-Цилемский район (P14), 15 — Ижемский район (P15), 16 — Печорский район (P16), 17 — Усинский район (P17), 18 — Интинский район (P18), 19 — Воркутинский район (P19).

Note. Areas included in the Southern Zone: 1 — Priluzsky District (S1), 2 — Koygorodsky District (S2); Districts included in the Central Zone: 3 — Sysolsky District (C3), 4 — Syktyvkar and Syktyvdinsky District (C4), 5 — Kortkerosky District (C5), 6 — Ust-Kulomsky District (C6), 7 — Ust-Vymsky District (C7); Districts included in the Northern Zone: 8 — Udorsky District (N8), 9 — Knyazhpogostsky District (N9), 10 — Uktinsky District (N10), 11 — Sosnogorsky District (N11), 12 — Troitsko-Pechorsky District (N12), 13 — Vuktyl'sky District (N13); Districts included in the Polar Zone: 14 — Ust-Tsilemsky District (P14), 15 — Izhemsky District (P15), 16 — Pechorsky District (P16), 17 — Usinsky District (P17), 18 — Intinsky District (P18), 19 — Vorkutinsky District (P19).

ди, покрытые молодыми лесами, увеличились на территориях 2 районов центральной зоны (С5 — 111,5% и С6 — 104%) и 2 районов северной зоны (N8 — 107,6% и N13 — 114,1%), значительно уменьшились на территориях 2 районов южной зоны (S1 — 83,7% и S2 — 77,4%) и 2 районов центральной зоны (С3 — 79,3% и С7 — 94,8%). На территории остальных районов южной, центральной и северной зон процент соотношения площадей молодняков и средневозрастных лесов за анализируемый период не претерпел значительных изменений ( $\pm 3,7\%$  и менее).

В работе использованы географические и демографические (<http://rkomi.ru>, <https://ru.wikipedia.org>, <http://komi.gks.ru>), экологические (<http://gis.rkomi.ru>, <http://www.agiks.ru>) и эпидемиологические данные о РК (государственная статистическая и ведомственная отчетность, формируемая ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Коми).

## Результаты

### Вид, численность клещей и их инфицированность возбудителями КВЭ и КБ

Наибольшее обилие иксодовых клещей регистрируется в РК во второй половине мая — первой половине июня. Для определения доминирующего вида путем случайной выборки был исследован 241 экземпляр клещей: 225 (93,4%) оказались *Ixodes persulcatus*, 14 (6,6%) — *Ixodes ricinus*.

Среднемноголетний показатель обилия клещей, собранных на флаг в течение мая—июня в 2000—2005 гг., составил 0,37 имаго за флаго-час в южной зоне РК (S1, S2). В центральной зоне (С3, С4, С6, С7) в этот период клещи не были выявлены. Среднемноголетний показатель обилия клещей, собранных на флаг в течение мая—июня в 2006—2017 гг., составил 1,11 имаго за флаго-час в южной зоне РК (S1, S2) и 0,33 имаго за флаго-час в центральной зоне РК (С3, С4, С6, С7).

При исследовании в 2000—2008 гг. 104 голодных клещей, собранных с растительности на флаг в центральной и южной зонах РК, вирус клещевого энцефалита не был обнаружен. Напротив, в 2009—2017 гг. возбудитель клещевого энцефалита был выявлен у 73 (5,16%) из 1416 голодных клещей, собранных с растительности на флаг в районах южной и центральной зон РК (S1, S2, С3, С4, С6, С7) на тех же территориях, где собирали клещей в предыдущий девятилетний период.

В 1998—2008 гг. 1957 клещей были собраны с людей и домашних животных (незначительное количество, как правило, с собак, иногда — с кошек). Средняя их инфицированность вирусом клещевого энцефалита составила 5,93%. Причем вирусофорные клещи были обнаружены в 9 районах: S1, S2, С3, С4, С5, С6, С7, N9 и N12.

В 2009—2017 гг. исследовали 10 820 клещей, снятых с людей и домашних животных. Их средняя инфицированность вирусом клещевого энцефалита составила уже 11,21%, то есть значительно выше, чем в 1998—2008 гг. Вирусофорные клещи были выявлены в 13 районах: S1, S2, С3, С4, С5, С6, С7, N8, N9, N10, N11, N12 и N13.

Исследования клещей на их инфицированность *B. burgdorferi* стали проводиться в РК с 2010 г. Было изучено 1317 экземпляров голодных клещей, собранных с растительности на флаг в южной и центральной зонах РК (S1, S2, С3, С4, С6, С7), а также 2 клеща из северного района (N9). *B. burgdorferi* была выявлена у 321 клеща (24,34%) из 5 районов: S1, S2, С3, С4, С6. Доля инфицированных клещей увеличилась с 9,5% в 2010 г. до 34,7% в 2017 г. За 2015—2017 гг. было исследовано 684 экземпляра клещей, собранных с людей, из 14 районов: S1, S2, С3, С4, С5, С6, С7, N8, N9, N10, N11, N12, N16. *B. burgdorferi* была выявлена у 107 клещей (15,64%) из 9 районов: S1, С3, С4, С5, С6, С7, N10, N11 и N12.

### Численность жителей, пострадавших от укусов иксодовых клещей

До 1994 г. жители только 4 районов РК (S1, S2, С3, С4), расположенных в южной и центральной зонах, обращались за медицинской помощью из-за нападения клещей.

Ареал обитания клещей стал увеличиваться с 1994 г. В период с 1994 по 2005 г. количество районов, в которых регистрировались случаи укусов людей клещами, увеличилось до 8 (S1, S2, С3, С4, С5, С6, С7, N9), включая 1 район северной зоны. В период с 2006 по 2017 г. жители 14 районов (S1, S2, С3, С4, С5, С6, С7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N16), включая все северные районы и 1 полярный, страдали от укусов.

Резкое увеличение количества жителей, пострадавших от укусов клещей, было отмечено в 2006 г. (948 человек). В дальнейшем этот показатель периодически увеличивался в 1,5—2,5 раза по сравнению с показателем 2006 г. С 1994 по 2017 гг. количество жителей, обратившихся за медицинской помощью из-за укусов клещей на территории РК, выросло в среднем с 278,5 человек в год в период 1994—2005 гг. до 1663,9 человек в год в период 2006—2017 гг., то есть этот показатель увеличился в 6 раз при сравнении двух двенадцатилетних периодов.

Средний ППК в 1994—2005 гг. составил 62,77, а в 2006—2017 гг. — 262,63, то есть он вырос в 4,2 раза. Наиболее выраженный рост ППК наблюдался в 2011 и 2014 гг. — 391,9 и 381,39 соответственно (рис. 2).

Существенно продлился период активности клещей. Так, если до 2004 г. включительно обращения за медицинской помощью отмечались только в течение четырех месяцев (май—август),

то с 2005 г. — в течение пяти месяцев (апрель–август), с 2010 г. — в течение шести месяцев (апрель–сентябрь).

По месту нападения клещей в период 2009–2017 гг. случаи распределились следующим образом: при нахождении в лесу — 48,2%, при нахождении на дачном (садовом) участке — 35,8%, при посещении парков (скверов) в населенном пункте — 6,9%, при посещении кладбищ — 2,9%, в неустановленном месте — 2,6%, за пределами РК — 3,6%.

### Заболееваемость населения КВЭ

Для наглядности анализируемых трендов заболеваемости КВЭ период наблюдения разделен на четыре равные отрезка, по 12 лет каждый:

- I: 1970–1981 гг.;
- II: 1982–1993 гг.;
- III: 1994–2005 гг.;
- IV: 2006–2017 гг.

С 1970 по 2017 г. в РК было зарегистрировано 213 «местных» случаев КВЭ, причем заболеваемость имела явную тенденцию к росту. Так, в I периоде было зарегистрировано всего 15 случаев КВЭ, ПЗ-КВЭ был незначителен — 0,13, во II периоде зарегистрировано 5 случаев КВЭ, среднегодовой ПЗ-КВЭ — 0,04. В III периоде выявлено 36 больных КВЭ, ПЗ-КВЭ — 0,28, а в IV периоде диагностировано 157 больных КВЭ, ПЗ-КВЭ составил 1,44. Следует отметить шестилетний пик среднегодового ПЗ-КВЭ в середине IV периода (2009–2014 гг.), когда он является особенно выраженным — 1,98. В последние годы ПЗ-КВЭ стабилизировался, более того, наметилась тенденция на некоторое снижение этого показателя. Тренды ПЗ-КВЭ в РК и России в целом имеют противоположные направления: в РФ после 1999 г. ПЗ-КВЭ снижается, а в РК — существенно увеличивается, превысив в 2010 г. всероссийский показатель (рис. 3).

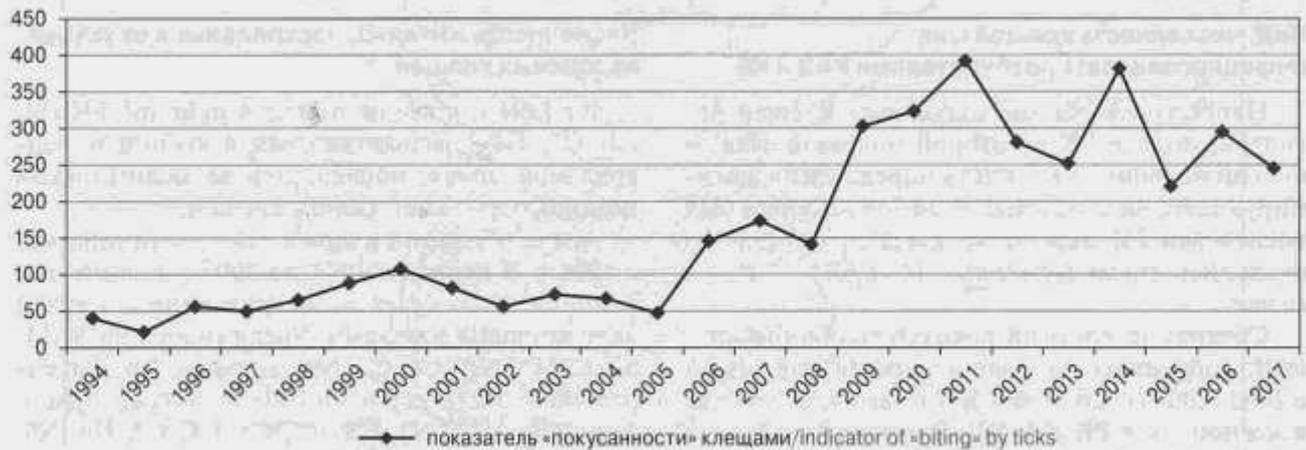


Рисунок 2. Показатель «покусанности» клещами (ППК) в Республике Коми за 1994–2017 гг.

Figure 2. Indicator of biting by ticks in the Republic of Komi for 1994–2017

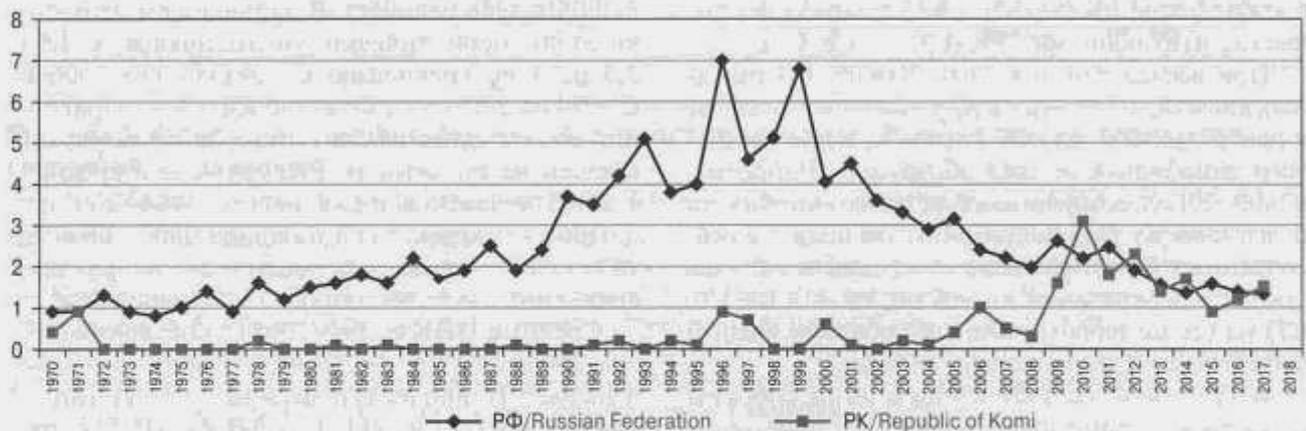


Рисунок 3. Показатели заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в Российской Федерации (РФ) и Республике Коми (РК) за 1970–2017 гг.

Figure 3. Incidence rates of tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation (RF) and the Republic of Komi (RK) for 1970–2017

За последние годы значительно расширилась на север территория, на которой выявлялись больные КВЭ. Так, в I и во II периодах случаи КВЭ отмечены только в 2 районах южной зоны (S1, S2), в III периоде — в 2 районах южной зоны (S1, S2) и 1 районе центральной зоны (C4), а в IV периоде — в 9 районах южной, центральной и северной зон (S1, S2, C3, C4, C5, C6, C7, N9, N12).

Отмечаются различия в половозрастном составе заболевших КВЭ: мужчины на протяжении всего периода наблюдения болеют в 2,7 раз чаще, чем женщины.

КВЭ регистрируется у жителей всех возрастов. У лиц старше 30 лет КВЭ диагностируется в 2,8 раза чаще, чем у более молодых. Хотя доля подростков 10–14 лет в период с 1996 по 2005 г. составляла всего 12,1% от всех больных, заболеваемость среди лиц этого возраста в 1,4 раза превышает аналогичный показатель среди всего населения РК (0,43 и 0,29 на 100 тыс. соответственно). В 2006–2017 гг. заболеваемость среди

подростков была несколько меньше, чем среди всех жителей РК, однако она по-прежнему оставалась достаточно высокой (табл. 1 и 2).

КВЭ в равной степени болеют лица как из числа работающего населения (но не работники леса), так и из числа неработающего населения (безработные и пенсионеры), причем обе категории составляют основную часть заболевших — 77,9%; доля заболевших КВЭ в группе риска, связанного с лесом, — 6,3%.

Наибольшее количество заболевших КВЭ зарегистрировано в июне и июле — 73,7%, на май и август приходится 25,3%, на сентябрь — 1,0%.

Диагностировано 5 случаев микст-инфекции КВЭ и КБ на территориях C4, C6, S1.

В 1996, 2000, 2009 и 2013 гг. исход 5 случаев КВЭ был летальным — в 4-х случаях от менингоэнцефалитической формы и в 1-м случае от очаговой формы, заболевания были зарегистрированы на территориях S1, C4, C3 и C5 соответственно.

**Таблица 1. Дифференциация заболевших клещевым вирусным энцефалитом в Республике Коми по возрасту в различные периоды**

Table 1. Differentiation of patients with tick-borne viral encephalitis in the Komi Republic by age in different periods

Показатели заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом Incidence rates of tick-borne viral encephalitis	Возраст заболевших клещевым вирусным энцефалитом Age of patients with tick-borne viral encephalitis								всего in all
	0–4	5–9	10–14	15–17	18–30	31–40	41–60	61 и >	
<b>Период с 1996 по 2005 г.</b> Period from 1996 to 2005									
Количество заболевших, абс. Number of cases, abs.	2	2	4	2	2	9	7	5	33
Количество заболевших, на 100 тыс. населения данного возраста Number of cases per 100 thousand population of the same age	0,374	0,295	0,430	0,328	0,093	0,485	0,225	0,389	0,296
Долевое распределение заболевших, % Share distribution of cases, %	6,06	6,06	12,12	6,06	6,06	27,27	21,21	15,15	100
<b>Период с 2006 по 2017 г.</b> Period from 2006 to 2017									
Количество заболевших, абс. Number of cases, abs.	6	6	5	3	18	31	61	27	157
Количество заболевших, на 100 тыс. населения данного возраста Number of cases per 100 thousand population of the same age	0,882	0,981	0,851	0,764	0,817	1,788	1,816	1,950	1,434
Долевое распределение заболевших, % Share distribution of cases, %	3,82	3,82	3,18	1,91	11,46	19,75	38,85	17,20	100
<b>Период с 1996 по 2017 г.</b> Period from 1996 to 2017									
Количество заболевших, абс. Number of cases, abs.	8	8	9	5	20	40	68	32	190
Количество заболевших, на 100 тыс. населения данного возраста Number of cases per 100 thousand population of the same age	0,658	0,621	0,593	0,499	0,459	1,114	1,051	1,199	0,859
Долевое распределение заболевших, % Share distribution of cases, %	4,21	4,21	4,74	2,63	10,53	21,05	35,79	16,84	100

**Таблица 2. Дифференциация заболевших клещевым вирусным энцефалитом в Республике Коми по полу по отношению ко всему населению и к мужскому или женскому населению соответственно**  
 Table 2. Differentiation of patients with tick-borne viral encephalitis in the Komi Republic by sex in relation to the entire population and to the male or female population respectively

Периоды Periods	Лица, заболевшие клещевым вирусным энцефалитом Persons with tick-borne viral encephalitis					
	Мужчины Men			Женщины Women		
	абс. abs.	на 100 тыс. всего населения per 100 thousand of the total population	на 100 тыс. мужчин per 100 thousand men	абс. abs.	на 100 тыс. всего населения per 100 thousand of the total population	на 100 тыс. женщин per 100 thousand women
1996–2005	23	0,206	0,416	10	0,090	0,177
2006–2017	116	2,011	2,238	41	0,374	0,711
1996–2017	139	0,629	1,298	51	0,231	0,447

Самыми распространенными формами КВЭ в РК являются лихорадочная, менингеальная и менингоэнцефалитическая, на их долю пришлось по 34,2, 33,7 и 23,7% соответственно; с 2008 г. КВЭ периодически стал проявляться в виде очаговых форм (5,3%); на другие формы заболевания (стертые, инapparантные) пришлось 3,2% от всех случаев заболевания за анализируемый период.

#### Заболеваемость населения КБ

Для наглядности анализируемых трендов заболеваемости ПЗ-КБ за анализируемый 21-летний период разделен на два отрезка:

- I: 1997–2005 гг. (9 лет);
- II: 2006–2017 гг. (12 лет).

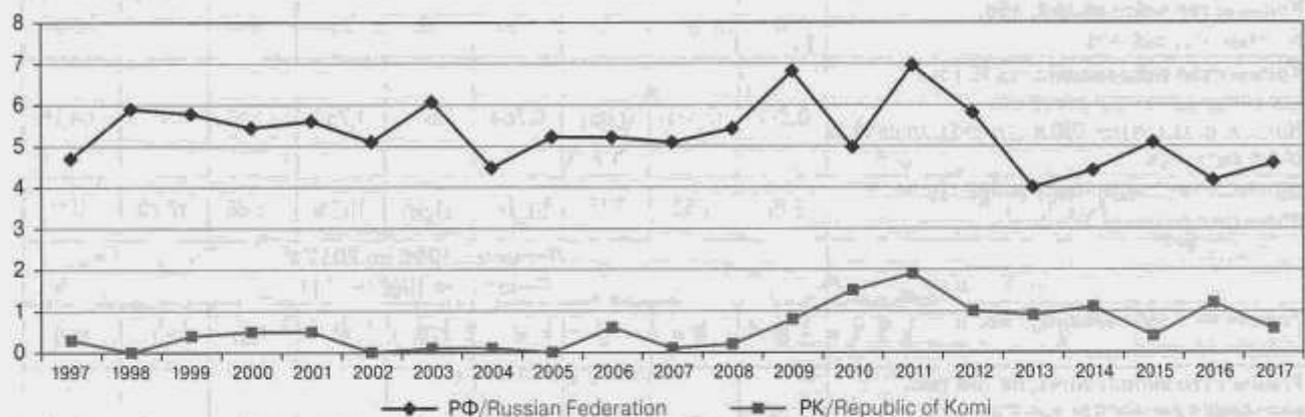
С 1997 по 2017 г. в РК было зарегистрировано 110 «местных» случаев КБ. В первый период заболевания регистрировались не ежегодно (только в течение 6 лет из 9 лет). Во втором периоде заболевания регистрировались ежегодно, ПЗ-КБ в течение периода изменялись волнообразно, но в целом этот показатель имел явную тен-

денцию к росту (рис. 4). Среднегодовой ПЗ-КБ в I периоде был незначителен (0,21). Во II периоде он вырос почти в 4 раза (0,8). Следует также отметить шестилетний пик среднегодового ПЗ-КБ в середине II периода (2009–2014 гг.) (1,2).

За последние годы расширилась на север территория, на которой выявлялись больные КБ. Так, в I периоде случаи КБ отмечены на 5 территориях (S1, S2, C3, C4, C5), во II периоде — на 8 территориях (S1, S2, C3, C4, C5, C6, C7, N10).

Основные черты эпидемиологии КБ сходны с таковыми при КВЭ:

- по половозрастному составу: количество заболевших мужчин больше в 2,9 раза количества заболевших женщин;
- КБ регистрируется у жителей всех возрастов, количество лиц старше 30 лет в 3,8 раза больше количества лиц, не достигших 30 лет; до 2006 г. КБ не регистрировался у детей моложе 10 лет; в течение 1997–2017 гг. доля детей 0–4 лет и 5–9 лет среди всех заболевших была сравнительно небольшой (1,9 и 2,7% соответственно), однако заболеваемость детей



**Рисунок 4. Показатели заболеваемости клещевым боррелиозом в Российской Федерации и Республике Коми за 1997–2017 гг.**

Figure 4. Incidence rates of tick-borne borreliosis in the Russian Federation and the Komi Republic for 1997–2017

этих возрастных групп выше, чем у подростков 10–14 и 15–17 лет, и составляет 0,17 и 0,23 соответственно для детей до 4 лет и 5–9 лет (0,07 и 0,10 соответственно для детей 10–14 и 15–17 лет [табл. 3 и 4]);

– по социально-профессиональному составу: КБ в равной степени болеют лица как из числа работающего населения (но не работники леса), так и из числа неработающего населения (безработные и пенсионеры), причем обе категории составляют основную часть заболевших — 80,0%; доля заболевших, относящихся к группе риска (работники леса), составила 11,4%;

– основная доля лиц, заболевших КБ, зарегистрирована в июне и июле — 70,5%, на май и август приходится 25,7%, на сентябрь — 1,9%, на январь и февраль — 1,9% (случаи поздней диагностики).

### Специфическая и неспецифическая профилактика КВЭ

Проведение вакцинации от КВЭ в обязательном порядке организовано для лиц из групп профессионального риска, работа которых связана с пребыванием в лесу: с 1997 г. она проводилась только в 2 южных районах (S1, S2), с 2001 г. — еще в 2 центральных районах (С3, С4), с 2008 г. — еще в 1 центральном районе (С6). Кроме того, вакцинация от КВЭ в добровольном порядке проводится и в других районах РК для лиц из групп профессионального риска, а также среди обычных граждан. Количество лиц, вакцинированных и ревакцинированных от КВЭ, ежегодно увеличивается: в 1997 г. было привито 456 человек, в последние 4 года анализируемого периода число привитых составляет порядка 35–40 тыс. человек в год. Случаи заболевания КВЭ среди лиц, привитых от него,

**Таблица 3. Дифференциация заболевших клещевым боррелиозом в Республике Коми по возрасту в различные периоды**

Table 3. Differentiation of patients with tick-borne borreliosis in the Komi Republic by age in different periods

Показатели заболеваемости клещевым боррелиозом Incidence rates of tick-borne borreliosis	Распределение лиц, заболевших клещевым боррелиозом, по возрасту Distribution of persons with tick-borne borreliosis by age								всего in all
	0–4	5–9	10–14	15–17	18–30	31–40	41–60	61 и >	
<b>Период с 1997 по 2005 г.</b> Period from 1997 to 2005									
Количество заболевших, абс. Number of cases, abs.	0	0	1	0	1	5	8	3	18
Количество заболевших, на 100 тыс. населения данного возраста Number of cases per 100 thousand population of the same age	0,000	0,000	0,122	0,000	0,051	0,307	0,284	0,257	0,180
Долевое распределение заболевших, % Share distribution of cases, %	0,00	0,00	5,56	0,00	5,56	27,78	44,44	16,67	100
<b>Период с 2006 по 2017 г.</b> Period from 2006 to 2017									
Количество заболевших, абс. Number of cases, abs.	2	3	0	1	14	11	38	18	87
Количество заболевших, на 100 тыс. населения данного возраста Number of cases per 100 thousand population of the same age	0,294	0,491	0,000	0,255	0,635	0,634	1,132	1,300	0,794
Долевое распределение заболевших, % Share distribution of cases, %	2,30	3,45	0,00	1,15	16,1	12,64	43,68	20,69	100
<b>Период с 1997 по 2017 г.</b> Period from 1997 to 2017									
Количество заболевших, абс. Number of cases, abs.	2	3	1	1	15	16	46	21	105
Количество заболевших, на 100 тыс. населения данного возраста Number of cases per 100 thousand population of the same age	0,165	0,233	0,066	0,100	0,344	0,446	0,711	0,787	0,475
Долевое распределение заболевших, % Share distribution of cases, %	1,90	2,86	0,95	0,95	14,29	15,24	43,81	20,00	100

**Таблица 4. Дифференциация заболевших клещевым боррелиозом в Республике Коми по полу по отношению ко всему населению и к мужскому или женскому населению соответственно**

Table 4. Differentiation of cases of tick-borne borreliosis in the Komi Republic by sex in relation to the entire population and to the male or female population respectively

Периоды Periods	Лица, заболевшие клещевым боррелиозом Persons with tick-borne borreliosis					
	Мужчины Men			Женщины Women		
	абс. abs.	на 100 тыс. всего населения per 100 thousand of the total population	на 100 тыс. мужчин per 100 thousand men	абс. abs.	на 100 тыс. всего населения per 100 thousand of the total population	на 100 тыс. женщин per 100 thousand women
1997–2005	15	0,150	0,304	3	0,030	0,059
2006–2017	63	0,575	1,216	24	0,219	0,416
1997–2017	78	0,353	0,728	27	0,122	0,237

стали регистрироваться с 2009 г. Всего за 2009–2016 гг. после проведенного курса вакцинации КВЭ заболело 14 человек из 126 (11,1%). В период 2006–2017 гг. меры экстренной специфической профилактики применялись к 45,6% людей, пострадавшим от укусов клещей. Несмотря на применение иммуноглобулина в первые дни после укуса клеща, после проведения экстренной специфической профилактики КВЭ заболело 18 человек из 157 за 2006–2017 гг. (11,5%).

Акарицидные обработки в РК начали проводиться с 2005 г. Основной используемый препарат — Акаритокс. Обрабатывались территории детских летних оздоровительных учреждений, санаториев, школ, детских садов, мест массового отдыха (парков и скверов), кладбищ. Обработки проводились в основном в мае, значительно меньше — в июне и июле. При выявлении клещей в ходе энтомологического контроля проводились повторные обработки. В 2005 г. акарицидные обработки проводились на территории только 1 района (С4), с 2006 г. — на территории еще 5 районов (S1, S2, С3, С5, С6), с 2011 г. — на территории еще 3 районов (С7, N8, N9). Площадь акарицидных обработок при этом увеличилась со 157 га в 2005 г. до 381 га в среднем с 2008 г.

## Обсуждение

За последние десятилетия произошли существенные изменения биотических компонентов ландшафтов на Европейском Севере РФ. Наблюдается расширение лесных зон в северном направлении, что обуславливает экспансию на северные территории многих видов диких млекопитающих, которые являются основными прокормителями иксодовых клещей. Сравнение данных, полученных нами при сборе клещей на флаг в 2006–2017 гг. и 2000–2005 гг. в РК, свидетельствует о росте их численности за последние годы в южной зоне

республики и экспансии этих кровососущих на север. Эти выводы косвенно подтверждаются сведениями о нападении клещей на людей. Так, до 1994 г. жители лишь четырех южных и центральных районов республики отмечали нападение клещей, а в 2006–2017 гг. жители всех северных и одного полярного (P16) района обращались по этому поводу за медицинской помощью. Средние значения ППК в 2006–2017 гг., по сравнению с 1994–2005 гг., выросли более чем в четыре раза. Значительный подъем ППК в определенной степени можно объяснить более частым обращением за медицинской помощью в связи с возросшей осведомленностью населения об опасных последствиях нападения клещей. Вместе с тем данные о регистрации случаев КВЭ на новых территориях РК, где ранее эта инфекция не регистрировалась, подтверждает распространение зараженных вирусом КЭ клещей на север. Ранее северная граница обитания иксодовых клещей проходила значительно южнее. За сорокалетний период наблюдения миграция клещей из южных районов РК на север составила не менее 150–200 км [6]. Аналогичные процессы наблюдаются на граничащих с РК территориях, например в Архангельской области [23] и Республике Карелия [24]. Причиной этого стало существенное повышение как среднегодовых температур, так и суммы «эффективных» температур, определяющих удовлетворительные условия обитания *I. persulcatus* и удлинение периода их активности [38]. Быстрому распространению клещей, инфицированных вирусом КЭ, в значительной степени способствуют мигрирующие птицы [29, 34, 39].

Результаты данной работы несколько расширяют наши знания о причинах роста численности иксодовых клещей и заболеваемости КВЭ в РК. Как известно, вырубка леса меняет микроклимат местообитаний, что обуславливает резкие изменения в составе и структуре

растений и животных. На этих территориях начинают бурно расти мелколиственные породы деревьев, в надпочвенном покрове травы замещают мхи и кустарники коренных таежных ассоциаций, что приводит к увеличению количества зайцев, некоторых копытных, птиц и мышевидных — прокормителей иксодовых клещей. Перечисленные факты создают благоприятные условия для размножения пастбищных иксодид [9, 25]. Существенная трансформация растительного покрова в отдельных районах РК, обусловленная вырубкой лесов, может косвенно стимулировать рост численности *I. persulcatus*. Хотя реально оценить роль этого фактора на подъем заболеваемости КВЭ весьма сложно, можно предположить, что смена спелых и перестойных лесов на молодняки, например, в районе С6, обусловила рост числа прокормителей иксодовых клещей и, как следствие, рост численности последних. В этом и других районах, где трансформация биотических компонентов ландшафтов наиболее выражена, существенно увеличилось количество пострадавших от присасывания клещей жителей (С5, N8 и N12) и был зарегистрирован выраженный подъем заболеваемости (С5 и С6). Напротив, площадь молодых лесов и заболеваемость КВЭ синхронно снизились в районе S2.

Очевидно, что влияние трансформации лесов на заболеваемость КВЭ носит пока локальный характер и не может определять резкий рост этого показателя на всей территории РК. Практическое значение данного фактора обусловлено тем, что обеспечение рационального ведения лесного хозяйства может и должно стать одним из компонентов комплексной программы по профилактике клещевых инфекций в РК.

Увеличение инфицированности *I. persulcatus*, выявленное нами в последние годы как у клещей, собранных с растительности, так и у клещей, собранных с пострадавших людей и животных, равно как и удлинение периода их активности до 6 месяцев, может рассматриваться как фактор, в некоторой степени влияющий на рост заболеваемости КВЭ. Наши данные о большей вирусофорности клещей, снятых с людей и животных, по сравнению с аналогичными показателями у голодных клещей, собранных на флаг, совпадают с данными других исследователей [5, 12], что в определенной степени связано с увеличением двигательной активности клещей, инфицированных вирусом КЭ [1].

Среднегодовые ПЗ-КВЭ в 2006–2017 гг. по сравнению с таковыми в 1970–1981 и 1982–1993 гг., увеличились в 11 и 36 раз соответственно как за счет роста количества случаев КВЭ в южной зоне РК, так и за счет регистрации этой инфекции на новых территориях в центральной

и северной зонах республики. Стабилизация и даже небольшое снижение заболеваемости КВЭ с 2012 г., возможно, в определенной мере обусловлены возросшим объемом специфической профилактики.

Резкий подъем заболеваемости КВЭ не может быть объяснен только повышением квалификации врачей и, как следствие, улучшением диагностики этой инфекции. Ранее было установлено, что инфицирование населения РК вирусом КВЭ резко возросло за последние годы. Так, показатели серопревалентности жителей РК к этому возбудителю существенно увеличились в южной и центральной частях региона. В северных районах республики также наблюдается выраженная тенденция к росту этого показателя. При этом необходимо отметить, что ряд центральных и северных территорий РК, где в сыворотках крови жителей были обнаружены антитела к вирусу КВЭ, в настоящее время официально не являются эндемичными по этой инфекции [37]. Высокие показатели серопревалентности в отношении вируса КВЭ были установлены также у невакцинированных от КВЭ жителей Архангельской области (7,9%), при этом в некоторых районах этот показатель был значительно выше: в Красноборском — 20%, в Каргопольском — 20,9% [23]. Основной причиной подъема заболеваемости КВЭ в РК является миграция клещей на «новые» территории, обусловленная повышением температуры воздуха, особенно в период активности клещей [38]. Рост заболеваемости КВЭ отмечается на граничащих с РК территориях РФ и в северных странах Европы, где также регистрируется расширение ареала обитания клещей [23, 24, 32, 33, 35].

В противоположность этому, в России в целом начиная с 1999 г. наблюдается значительное снижение заболеваемости этой инфекцией.

Как и на большинстве территорий Северо-Западного федерального округа, в структуре заболевших КВЭ в РК в 1996–2017 гг. значительно преобладают мужчины, что объясняется более частым посещением ими мест обитания клещей в связи с большей склонностью к занятию рыбалкой, охотой, сбору грибов и длительному пребыванию на территориях лесной зоны [3]. В 2006–2017 гг. на фоне роста заболеваемости КВЭ гендерные различия усилились.

В РК, как и по России в целом [12], случаи КВЭ были выявлены у людей всех возрастов, при этом доля заболевших среди жителей старше 30 лет была выше, чем среди более молодого населения. Вместе с тем в отдельные годы заболеваемость среди подростков 10–14 лет была выше, чем в других возрастных группах. Наши данные совпадают с наблюдениями, полученными в Красноярском крае, где, наряду

со взрослыми, часто болеют дети в возрасте 7–14 лет [14]. Относительно высокие показатели заболеваемости детей в РК аргументируют проведение целенаправленных адресных профилактических мероприятий для лиц этой возрастной категории, включая санитарно-просветительную работу и вакцинацию.

На наш взгляд, представления о том, что КВЭ перестал быть профессиональной инфекцией [18], не в полной мере соответствуют сегодняшним реалиям. Доля зарегистрированных случаев КВЭ в группах профессионального риска, связанного с лесом, в РК действительно сравнительно невелика, однако работники соответствующих профессий составляют лишь малую часть населения (примерно 0,3%). Поэтому заболеваемость среди этого контингента более чем в 20 раз выше, чем среди остальных жителей республики. Представленные данные свидетельствуют о том, что в плане профилактических мероприятий группы профессионального риска по-прежнему являются приоритетными. Эти лица должны подлежать обязательной вакцинации не только в эндемичных по КВЭ районах, но и в граничащих с ними более северных районах, которые официально не признаны эндемичными по КВЭ, но в которых укусы клещей регистрируются уже ежегодно.

Объем специфической профилактики (вакцинации, серопротекции) КВЭ в РК существенно увеличился. Так, количество вакцинированных от КВЭ жителей РК в последние годы наблюдения увеличилось по сравнению с 1997 г. более чем в 70 раз; более чем 45% лиц, пострадавших от нападения клещей, был введен специфический иммуноглобулин. Большинство авторов отмечают высокую эффективность специфических методов профилактики КВЭ [5, 15, 21, 31]. Существует мнение, что современные вакцины защищают от заболевания КВЭ 95–98% лиц, подвергшихся нападению зараженных клещей [17], а иммунопрофилактика предупреждает развитие манифестных форм болезни в среднем в 79% случаев [16].

Не оспаривая положение об эффективности специфической профилактики КВЭ, мы считаем, что необходимо обратить особое внимание на случаи, когда применение этих препаратов не предотвращало развитие болезни. Так, значительная часть жителей РК (более 11%), получивших данные профилактические препараты, заболели КВЭ. Похожая картина наблюдалась в России в целом, где среди зарегистрированных больных 28% получали серопротекцию, а 11% были вакцинированы [13]. В Курганской области среди больных КВЭ вакцинированные от этой инфекции составляли в разные годы от 19,9 до 29,5%, при этом уровень очаговых форм КВЭ у вакцинированных пациентов

был достаточно высоким [19]. В Республике Казахстан КВЭ заболел военнослужащий срочной службы, прошедший полный курс вакцинации [7]. Описаны случаи развития очаговой формы КВЭ с летальным исходом у многократно вакцинированных пациентов, в сыворотках которых были выявлены высокие титры антител к вирусу КВЭ [19, 20].

Очевидно, что сказанное не означает отказа от вакцинации в отношении КВЭ. Напротив, мы полагаем необходимость ее расширения в отношении ранее перечисленных контингентов, поскольку в настоящее время других, более эффективных средств специфической профилактики этой инфекции пока не разработано. На наш взгляд, представленные сведения о заболеваниях КВЭ среди привитых и лиц, получивших специфический гамма-глобулин, обосновывают целесообразность всестороннего анализа возможных причин этих случаев (таких как дефекты при производстве препаратов, нарушения при их транспортировке и применении, генетическое несоответствие вакцинных и инфицирующих штаммов возбудителя, иммунопатологические реакции макроорганизма и др.), а так же разработки практических рекомендаций по повышению эффективности специфической профилактики этой болезни. Кроме того, следует значительно расширить пропаганду применения местных акарицидных препаратов в связи с тем, что клещи, циркулирующие в Северо-Западном федеральном округе России, являются переносчиками многих бактерий, против которых в настоящее время не разработаны специфические средства профилактики [28].

В РК имеет место выраженная сезонность заболевания КВЭ, обусловленная сезонной активностью клещей. Период наибольшего количества случаев заболевания КВЭ в РК практически совпадает с аналогичным периодом по России в целом [12], с умеренной поправкой на северное расположение этой территории.

Клинические формы проявления инфекции типичны для европейской части России, хотя в последние годы были выявлены новые для РК тенденции — стали регистрироваться наиболее тяжелые очаговые формы болезни, что в определенной степени противоречит мнению о перераспределении синдромов КВЭ в сторону более доброкачественного течения инфекции [18]. Предположительно, тяжелое течение КВЭ в РК может быть обусловлено большей уязвимостью жителей, ранее не подвергавшихся нападению клещей и не встречавшихся с возбудителем клещевого энцефалита [30], что дополнительно обосновывает необходимость повышенного внимания к этой инфекции в центральной и северной зонах республики.

Летальные исходы стали регистрироваться в РК сравнительно недавно, что также свидетельствует о более тяжелом течении болезни, отмечающимся в последнее время. В период с 1996 по 2017 г. летальность составила 2,3%.

Этот показатель несколько выше, чем в целом по России в 2016 и 2017 гг. (1,6%), что предположительно, может быть связано с тем, что на территории РК большинство клещей *I. persulcatus* заражены КВЭ, который относится к дальневосточному генотипу, вызывающему высокую летальность [10].

Тренды заболеваемости КБ и КВЭ были схожи между собой. Так, наблюдался резкий подъем заболеваемости КБ и значительное расширение территории очага на север. Высокая доля инфицированности клещей *B. burgdorferi*, трудности распознавания безэритемных форм этой инфекции, позднее выявление IgM и IgG к боррелиям [2], в ряде случаев поздняя диагностика КБ (январь–февраль) позволяют предположить существенную гиподиагностику этой сравнительно новой для РК болезни. Так, за период с 1997 по 2006 г. у детей и подростков до 17 лет был диагностирован всего лишь один случай КБ. Показатели заболеваемости КБ на протяжении всего анализируемого периода в РК были ниже, чем КВЭ, хотя по России в целом эти показатели имеют противоположные соотношения (<https://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials>). Это косвенно может свидетельствовать о том, что у значительной части больных КБ в РК этиология болезни осталась невыясненной, что может иметь драматические последствия, так как результаты лечения существенно зависят от срока начала этиотропной терапии, прошедшего с момента инфицирования. У подавляющего большинства больных безэритемной формой КБ диагноз подтверждается спустя 1,5–6 месяцев от начала заболевания [2]. Нерациональное или поздно начатое лечение КБ приводит к хроническому течению болезни в 50% случаев, что обуславливает необходимость диспансерного наблюдения за переболевшими КБ с проведением клинико-лабораторного контроля [26].

Сезонное распределение случаев заболевания КБ и КВЭ, как правило, совпадало и соответствовало сезонным показателям активности клещей.

Большинство пациентов с диагнозом КБ, как и при КВЭ, — это мужчины в возрасте старше 30 лет.

КБ в РК носит ярко выраженный профессиональный характер, что, на наш взгляд, аргументирует целесообразность обязывать работодателей обеспечивать сотрудников в группах риска акарицидными препаратами для индивидуального использования.

Анализ современной литературы по инфекциям, передающимся иксодовыми клещами, позволяет считать, что любое заболевание, возникшее в результате присасывания клеща, следует рассматривать как потенциальную микст-инфекцию. Так, в Челябинской области сочетанное течение КБ и КВЭ наблюдали в 38,4% случаев [4], а в Красноярском крае — в 40% случаев [11]. Вовлечение в инфекционный процесс нервной системы при обеих инфекциях усложняет диагностику микст-инфекций [4, 8]. Было установлено, что на северо-западе России микст-инфекция без выраженных клинических проявлений встречается в 7,6 раза чаще, чем с развитием клинической картины заболеваний [26]. Зарегистрированные единичные случаи микст-инфекции КВЭ и КБ в РК едва ли отражают реальное их распространение. Диагностика и лечение инфекций, вызванных двумя и более клещевыми возбудителями, имеет свои особенности, которые должны учитываться инфекционистами [26].

Таким образом, в РК, как и на соседних территориях Европейского Севера России, имеет место экспансия иксодовых клещей на северные территории. Как было установлено нами ранее, основная причина расширения зоны обитания клещей — повышение температуры воздуха, особенно в период их активности [39]. Циркуляция патогенов, передающихся иксодовыми клещами, и, следовательно, заболеваемость клещевыми инфекциями в значительной степени находятся под контролем факторов внешней среды, которые действуют через организм переносчиков [22]. В настоящей работе показано, что наряду с климатическими изменениями трансформация растительного покрова в отдельных районах РК, обусловленная вырубкой лесов, может обуславливать локальный рост численности *I. persulcatus* на отдельных территориях.

Резкий рост заболеваемости КВЭ и КБ вызван целым комплексом причин: экспансией клещей на «новые» территории, ростом их численности и превалентности в отношении вируса клещевого энцефалита и *B. burgdorferi* — как собранных с травы на флаг, так и снятых с людей и животных, удлинением периода активности. Социальные факторы, такие как профессиональная деятельность жителей РК, возрастная активность подростков, рубка лесов и т. д., вероятно, вносят свой вклад в подъем заболеваемости КВЭ.

Полученные в ходе выполнения настоящего исследования новые знания об эколого-эпидемиологических характеристиках КВЭ и КБ в РК обосновывают необходимость проведения адресной профилактики «клещевых» инфекций с учетом местных особенностей. По нашему мнению, северные территории РК, на кото-

рых в последние годы были зарегистрированы случаи нападения клещей на жителей, следует рассматривать в качестве потенциально эндемичных, и в связи с этим необходимо:

- осуществлять контроль за рациональным ведением лесного хозяйства;
- обеспечивать работников групп профессионального риска средствами индивидуальной защиты от клещей, расширить за счет этих контингентов объем вакцинации в северных, потенциально эндемичных районах РК;
- с целью повышения качества диагностики КБ и своевременного рационального лечения этих больных проводить серологическое обследование на наличие антител к *B. burgdorferi* всех больных с подозрением на КВЭ;
- проводить диспансерное наблюдение за больными «клещевыми» инфекциями

- с целью своевременной терапии при хронизации инфекции;
- осуществлять санитарное просвещение и информирование населения, в том числе среди жителей северных, потенциально эндемичных районов РК, включая детей и подростков.

## Благодарности

Работа выполнена в соответствии с государственным контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу» по теме «Доคลินิกские исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

## Список литературы/References

1. Алексеев А.Н. Современное состояние знаний о переносчиках клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. 2007. № 5. С. 21–26. [Alekseev A.N. The present knowledge of tick-borne encephalitis vectors. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2007, no. 5, pp. 21–26. (In Russ.)]
2. Андропова Н.В., Миноранская Н.С., Миноранская Е.И. Специфический иммунный ответ и некоторые отдаленные результаты при остром течении иксодового клещевого боррелиоза и микст-инфекции клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2011. № 1. С. 54–57. [Andronova N.V., Minoranskaya N.S., Minoranskaya E.I. The specific immune response and some remote results in the acute course of tick-borne borreliosis and mixed-infections of tick-borne encephalitis and tick-borne borreliosis. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2011, no. 1, pp. 54–57. (In Russ.)]
3. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в Северо-Западном федеральном округе России. Аналитический обзор. Санкт-Петербург: Феникс, 2008. 120 с. [Infections transmitted by ixodid ticks in the North-West Federal Region of Russia. Analytical review. *St. Petersburg: Phoenix*, 2008. 120 p. (In Russ.)]
4. Конькова-Рейдман А.А., Злобин В.И. Клещевой полиморфизм иксодовых клещевых боррелиозов (микст-инфекция с клещевым энцефалитом) на территории Южно-Уральского региона России // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2011. № 1. С. 17–19. [Kon'kova-Reidman A.A., Zlobin V.I. Clinical polymorphism of Ixodes tick-borne borrelioses (mixed infection with tick-borne encephalitis) on the territory of South-Ural Region of Russia. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2011, no. 1, pp. 17–19. (In Russ.)]
5. Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И. Специфическая и неспецифическая профилактика клещевого энцефалита и иксодовых клещевых боррелиозов на южном Урале // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2012. № 4. С. 71–74. [Kon'kova-Reidman A.B., Zlobin V.I. Specific and nonspecific prevention of tick-borne encephalitis and ixodes borrelioses in southern Ural. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2012, no. 4, pp. 71–74. (In Russ.)]
6. Корабельников И.В. Особенности распространения природно-очаговых болезней при антропогенном воздействии на биосферу // Национальные приоритеты России. 2009. № 2. С. 77–80. [Korabelnikov I.V. Expansion of natural focal infections under anthropogenic impacts in biosphere. *Natsionalnye prioritety Rossii = National Priorities of Russia*, 2009, no. 2, pp. 77–80. (In Russ.)]
7. Лавренюк В.И., Дмитровский А.М., Егембердиева Р.А., Абдиева К. Случай заболевания клещевым энцефалитом у вакцинированного // Медицина Кыргызстана. 2014. № 2. С. 94–97. [Lavrenyuk V.I., Dmitrovsky A.M., Egemberdieva R.A., Abdieva K. Case of tick-borne encephalitis in a vaccinated patient. *Meditina Kyrgyzstana = Medicine of Kyrgyzstan*, 2014, no. 2, pp. 94–97. (In Russ.)]
8. Лобзин Ю.В., Козлов С.С. Трудности клинической диагностики микст-инфекций клещевого энцефалита и болезни Лайма // Клиническая медицина. 1997. № 12. С. 45–48. [Lobzin Yu.V., Kozlov S.S. Difficulties in the clinical diagnosis of mixed tick-borne encephalitis and Lyme disease infection. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 1997, no. 12, pp. 45–48. (In Russ.)]
9. Львов Д.К., Злобин В.И. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе // Вопросы вирусологии. 2007. № 5. С. 26–30. [Lvov D.K., Zlobin V.I. Prevention of tick-borne encephalitis at the present stage: strategy and tactics. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2007, no. 5, pp. 26–30. (In Russ.)]
10. Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова, Протопопова Е.В., Картышев М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах *Ixodes persulcatus* в северо-восточном регионе европейской части России // Паразитология. 2014. Т. 48, № 2. С. 131–149. [Mikryukova T.P., Chausov E.V., Konovalova S.N., Kononova J.V., Protopopova E.V., Kartashov M.Y.,

- Ternovoi V.A., Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova J.I., Loktev V.B. Genetic diversity of the tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks in northeastern European Russia. *Parazitologia = Parasitology*, 2014, vol. 48, no. 2, pp. 131–149. (In Russ.)
11. Миноранская Н.С., Миноранская Е.И. Клинико-эпидемиологическая характеристика микст-инфекций клещевого боррелиоза и клещевого энцефалита в Красноярском крае // Казанский медицинский журнал. 2013. Т. 94, № 2. С. 211–214. [Minoranskaya N.S., Minoranskaya E.I. Clinical and epidemiological characteristics of mixed infections of tick-borne borreliosis and tick-borne encephalitis in the Krasnoyarsk territory. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Kazan Medical Journal*, 2013, vol. 94, no. 2, pp. 211–214. (In Russ.)]
  12. Никитин А.Я., Андаев Е.И., Носков А.К., Пакскина Н.Д., Яценко Е.В., Веригина Е.В., Балахонov С.В. Особенности эпидемиологической ситуации по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2017 году и прогноз ее развития на 2018 год // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. № 1. С. 44–49. [Nikitin A.Ya., Andayev E.I., Noskov A.K., Pakschina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Balakhonov S.V. Peculiarities of the epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2017 and the forecast for 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2018, no. 1, pp. 44–49. (In Russ.)]
  13. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации // Вопросы вирусологии. 2007. Т. 52, № 5. С. 8–10. [Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Pakschina N.D. Organization of supervision of tick-borne virus encephalitis and ways of its prevention in the Russian Federation. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2007, vol. 52, no. 5, pp. 8–10. (In Russ.)]
  14. Опейкина Н.Н., Скударнов С.Е., Куртасова Л.М., Шульман А.В., Васильева А.А. Анализ заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом жителей Красноярского Края // Сибирское медицинское обозрение. 2015. № 2. С. 81–84. [Opejkina N.N., Skudarnov S.E., Kurtasova L.M., Shilman A.V., Vasileva A.A. The analysis of the morbidity of tick-borne viral encephalitis in the Krasnoyarsk Region. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = The Siberian Medical Review*, 2015, no. 2, pp. 81–84. (In Russ.)]
  15. Павленко Е.В., Леонова Г.Н., Майстровская О.С. Сравнительное изучение иммуногенности вакцин против клещевого энцефалита // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2007. № 11. С. 56–62. [Pavlenko E.V., Leonova G.N., Maistrovskaya O.S. A comparative study of the immunogenicity of tick-borne encephalitis vaccines. *Dalnevostochnii zhurnal infektsionnoy patologii = Far Eastern Journal of Infectious Pathology*, 2007, no. 11, pp. 56–62. (In Russ.)]
  16. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (обзор полувекowego опыта) // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2010. № 1. С. 53–59. [Penyevskaya N.A., Rudakov N.V. The effectiveness of the use of immunoglobulin preparations for post-exposure prophylaxis of tick-borne encephalitis in Russia (review of half a century of experience). *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2010, no. 1, pp. 53–59. (In Russ.)]
  17. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Рудакова С.А. Проблемные аспекты оценки эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики клещевого энцефалита // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. № 17 (5). С. 78–88. [Penyevskaya N.A., Rudakov N.V., Rudakova S.A. Problematic aspects of the evaluation of the epidemiological effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Epidemiologia i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2018, no. 17, pp. 78–88. (In Russ.)] doi: 110.31631/2073-3046-2018-17-5-78-88
  18. Погодина В.В., Карань Л.С., Колесникова Н.М., Левина Л.С., Маленко Г.В., Гамова Е.Г., Лесникова М.В., Килячина Ф.С., Есюнина М.С., Бочкова Н.Г., Шопенская Т.А., Фролова Т.В., Андаев Е.И., Трухина А.Г. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопросы вирусологии. 2007. № 5. С. 16–26. [Pogodina V.V., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Malenko G.V., Gamova Ye.G., Lesnikova M.V., Kilyachina A.S., Yesyunina M.S., Bochkova N.G., Shopenskaya T.A., Frolova T.V., Andayev Ye.I., Trukhina A.G. Evolution of tick-borne encephalitis and a problem of evolution of its causative agent. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2007, no. 5, pp. 16–26. (In Russ.)]
  19. Погодина В.В., Левина Л.С., Скрынник С.М., Травина Н.С., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Кармышева В.Я., Герасимов С.Г., Маленко Г.В., Перминов Л.В., Попов М.А., Бочкова Н.Г. Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента // Вопросы вирусологии. 2013. № 2. С. 33–37. [Pogodina V.V., Levina L.S., Skrynnik S.M., Travina N.S., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Karmyshova V.Ya., Gerasimov S.G., Malenko G.V., Perminov L.V., Popov M.A., Bochkova N.G. Tick-borne encephalitis with fulminant course and lethal outcome in patients after plural vaccination. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, no. 2, pp. 33–37. (In Russ.)]
  20. Погодина В.В., Лучинина С.В., Степанова О.Н., Стенько Е.А., Горфинкель А.Н., Кармышова В.Я., Герасимов С.Г., Левина Л.С., Чиркова Г.Г., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Маленко Г.В., Колесникова Л.И. Необычный случай летального исхода клещевого энцефалита у пациента, привитого вакцинами разных генотипов (Челябинская область) // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 1. С. 56–64. [Pogodina V.V., Luchinina S.V., Stepanova O.N., Stenko E.A., Gorfinkel A.N., Karmyshova V.Ya., Gerasimov S.G., Levina L.S., Chirkova G.G., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Malenko G.V., Kolesnikova L.I. An unusual case of fatal outcome of tick-borne encephalitis in a patient inoculated with vaccines of different genotypes (Chelyabinsk region). *Epidemiologia osobo opasnykh boleznei = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2015, no. 20, pp. 56–64. (In Russ.)]
  21. Романенко В.В., Анкудинова А.В., Килячина А.С. Эффективность программы массовой вакцинопрофилактики клещевого энцефалита в Свердловской области // Вестник УрГМА. Екатеринбург. 2010. № 21. С. 125–132. [Romanenko V.V., Ankudinova A.V., Kilyachina A.S. The effectiveness of the program of mass TBE vaccination in the Sverdlovsk Region. *Vestnik UrGMA. Yekaterinburg = Bulletin of the Ural State Medical Academy. Yekaterinburg*, 2010, no. 21, pp. 125–132. (In Russ.)]
  22. Сиротин М.Б., Коренберг Э.И. Влияние абиотических факторов на возбудителей инфекций, экологически связанных с иксодовыми клещами (на примере боррелий и вируса энцефалита) // Успехи современной биологии. 2019. Т. 130, № 2. С. 126–146. [Siroitin M.B., Korenberg E.I. The impact of abiotic factors on the infection pathogens ecologically related to ixodid ticks (by the example of borrelia and encephalitis virus). *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology*, 2019, vol. 130, no. 11, pp. 126–146. (In Russ.)] doi: 10.1134/S0042132419020091

23. Соколова О.В., Чашин В.П., Попова О.Н., Бузинов Р.В., Пасынкова М.М., Гудков А.Б. Эпидемиологические особенности распространения клещевого вирусного энцефалита в Архангельской области // Экология человека. 2017. № 4. С. 12–19. [Sokolova O.V., Chashin V.P., Popova O.N., Buzinov R.V., Pasyunkova M.M., Gudkov A.B. Epidemiological character of tick-borne viral encephalitis extension in the Arkhangelsk Region. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2017, no. 4, pp. 12–19. (In Russ.)] doi: 10.33396/1728-0869-2017-4-12-19
24. Субботина Н.С., Доршакова Н.В., Петрова А.В. Эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита в Северо-Западном регионе России // Экология человека. 2007. № 7. С. 15–19. [Subbotina N.S., Dorshakova N.S., Petrova A.V. Epidemiological characteristic of tick-borne encephalitis in North-West region of Russia. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2007, no. 7, pp. 15–19. (In Russ.)]
25. Токаревич К.Н., Вершинский Б.В., Перфильев П.П. Очерки ландшафтной географии зооантропонозов (Европейский Север России). Ленинград: Наука, 1975. 168 с. [Tokarevich K.N., Vershinsky B.V., Perfiliev P.P. Essays on landscape geography of zoonoses (European North of Russia). *Leningrad: Nauka*, 1975. 168 p. (In Russ.)]
26. Усков А.Н., Байгеленов К.Д., Бургазова О.А., Гринченко Н.Е. Современные представления о диагностике клещевых инфекций. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2008. № 7. С. 148–152. [Uskov A.N., Baygelenov K.D., Burgasova O.A., Grintchenko N.E. Present view on diagnostics of tick-borne infections. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2008, no. 7, pp. 148–152. (In Russ.)]
27. Филиппова Н.А. Фауна СССР. Паукообразные. Т. IV, вып. 4. Иксодовые клещи, подсемейство Ixodidae. Л.: Наука, 1977. С. 396. [Filippova N.A. Fauna of the USSR. Arachnida. Vol. IV, iss. 4. Ixodid ticks, subfamily Ixodinae. *Leningrad: Nauka*, 1977. 396 p. (In Russ.)]
28. Eremeeva M., Oliveira A., Moriarty J., Robinson J., Tokarevich N., Antyukova L., Pyanyh V.A., Emejanova O.N., Ignatjeva V.N., Buzinov R., Pyankova V., Dasch G.A. Detection and identification of bacterial agents in ixodes persulcatus schulze ticks from the north western region of Russia. *Vector-borne Zoonotic Dis.*, 2007, vol. 7: 42636. doi: 10.1089/vbz.2007.0112
29. Hasle G. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2013, vol. 3: 48. doi: 10.3389/fcimb.2013.00048
30. Hedlund C., Blomstedt Y., Schumann B. Association of climatic factors with infectious diseases in the Arctic and subarctic region — a systematic review. *Glob. Health Action*, 2014, vol. 7: 24161. doi: 10.3402/gha.v7.24161
31. Heinz F.X., Stiasny K., Holzmann H., Grgic-Vitek M., Kriz B., Essl A., Kundi M. Vaccination and tick-borne encephalitis, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013, vol. 19, no. 1, pp. 69–76. doi: 10.3201/eid1901.120458 PMID:23259984
32. Jaenson T.G., Hjertqvist M., Bergstrom T., Lundkvist A. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit Vectors*, 2012, vol. 5: 184. doi:10.1186/1756-3305-5-184
33. Skarpaas T., Golovljova I., Vene S., Ljostad U., Sjrursen H., Plyusnin A., Lundkvist A. Tickborne encephalitis virus, Norway and Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006, vol. 12, pp. 1136–1138. doi: 10.3201/eid1207.051567
34. Sparagano O., Georgeb D., Giangaspero A., Spitala E. Arthropods and associated arthropod-borne diseases transmitted by migrated birds. The case of ticks and tick-borne pathogens. *Vet. Parasitol.*, 2015, vol. 213, no. 1–2, pp. 61–66. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.08.028
35. Süss J. TBE — a short overview on epidemiological status in Europe. *ISW-TBE: Vienna*, 2012, pp. 2–3.
36. Tokarevich N., Tronin A., Blinova O., Buzinov R., Boltentsov V., Yurasova E., Nurse J. The impact of climate change on the expansion of Ixodes persulcatus habitat and the incidence of tick-borne encephalitis in the north of European Russia. *Glob. Health Action*, 2011, vol. 4, no. 1: 8448. doi: 10.3402/gha.v4i0.8448
37. Tokarevich N., Stoyanova N., Gnativ B., Kazakovtsev S., Blinova O., Revich B. Seroprevalence of tick-borne diseases in the population of the European North of Russia. *Med. Safety Glob. Health*, 2017, vol. 6, no. 1: 1000132. doi: 10.4172/2574-0407.1000132
38. Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. Impact of air temperature variation on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: the case of the Komi Republic. *Int. J. Circumpolar Health*, 2017, vol. 76: 1298882. doi: 10.1080/22423982.2017.1298882
39. Waldenstrom J., Lundkvist A., Falk K., Garpmo U., Bergstrom S., Lindegren G. Migrating birds and tick-borne encephalitis virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, pp. 1215–1258. doi: 10.3201/eid1308.061416.

**Авторы:**

**Гнатив Б.Р.**, зам. начальника отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Республике Коми, г. Сыктывкар, Россия;

**Токаревич Н.К.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией зооантропонозов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Gnativ B.R.**, Deputy Head of Epidemiological Surveillance Department of Rosпотребнадзор Office for the Republic of Komi, Syktyvkar, Russian Federation;

**Tokarevich N.K.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.11.2019  
Отправлена на доработку 11.11.2019  
Принята к печати 18.12.2019

Received 05.11.2019  
Revision received 11.11.2019  
Accepted 18.12.2019

# ЭТИОЛОГИЯ ГРИППОПОДОБНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У НАСЕЛЕНИЯ НОВОСИБИРСКА ВО ВРЕМЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЕЗОНА 2018–2019 гг.

О.Г. Курская<sup>1</sup>, А.В. Аношина<sup>2</sup>, Н.В. Леонова<sup>2</sup>, О.А. Симкина<sup>3</sup>, Т.В. Комиссарова<sup>3</sup>,  
Е.Ю. Есикова<sup>4</sup>, Л.Л. Позднякова<sup>4</sup>, И.А. Соболев<sup>1</sup>, Е.А. Прокопьева<sup>1</sup>,  
Т.А. Мурашкина<sup>1</sup>, Е.А. Казачкова<sup>1</sup>, А.Ю. Алексеев<sup>1</sup>, Д.М. Даниленко<sup>5</sup>,  
А.Б. Комиссаров<sup>5</sup>, К.А. Столяров<sup>5</sup>, А.В. Фадеев<sup>5</sup>, А.А. Соминина<sup>5</sup>,  
А.М. Шестопалов<sup>1</sup>, К.А. Шаршов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ НО Детская городская клиническая больница № 6, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ НО Детская городская клиническая больница № 3, г. Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> ГБУЗ НО Городская инфекционная клиническая больница № 1, г. Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции, приводя к значительному числу тяжелых случаев заболевания, требующих госпитализации пациентов, остаются глобальной проблемой здравоохранения. В рамках исследований «Глобальной сети по госпитальному надзору за гриппом» (Global Influenza Hospital Surveillance Network, GIHSN) мы оценили вклад вируса гриппа и других респираторных вирусов в развитие тяжелых форм гриппоподобных заболеваний, регистрируемых в условиях инфекционных стационаров г. Новосибирска в 2018–2019 гг. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью коммерческих тест-систем нами было проанализировано 484 назофарингеальных мазка от пациентов, госпитализированных с симптомами острых респираторных вирусных заболеваний. Вирусная этиология заболеваний была подтверждена у 69,8% обследованных пациентов. Вирусы гриппа выявлены в 47,1% случаев, при этом наблюдалась совместная циркуляция вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) у 20,7 и 26% пациентов соответственно, в то время как вирус гриппа В выявлен только в одном образце. Все проанализированные штаммы вируса гриппа А, выделенные в ходе исследования, антигенно были подобны вакцинным штаммам. Генетически штаммы, циркулировавшие в г. Новосибирске, были родственны вариантам вируса гриппа А, распространенным в России и в мире. Все случаи заболевания гриппом, требовавшие госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии, отмечались у пациентов в возрасте от 0 до 14 лет и были вызваны вирусом А(H1N1)pdm09. Другие респираторные вирусы

## Адрес для переписки:

Курская Ольга Григорьевна  
630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2,  
ФГБНУ Федеральный исследовательский центр  
фундаментальной и трансляционной медицины.  
Тел.: 8 913 741-23-46 (моб.). E-mail: kurskaya\_og@mail.ru

## Contacts:

Olga G. Kurskaya  
630117, Russian Federation, Novosibirsk, Timakov str., 2,  
Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine.  
Phone: +7 913 741-23-46 (mobile). E-mail: kurskaya\_og@mail.ru

## Для цитирования:

Курская О.Г., Аношина А.В., Леонова Н.В., Симкина О.А.,  
Комиссарова Т.В., Есикова Е.Ю., Позднякова Л.Л., Соболев И.А.,  
Прокопьева Е.А., Мурашкина Т.А., Казачкова Е.А., Алексеев А.Ю.,  
Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б., Столяров К.А., Фадеев А.В.,  
Соминина А.А., Шестопалов А.М., Шаршов К.А. Этиология  
гриппоподобных заболеваний у населения Новосибирска во время  
эпидемического сезона 2018–2019 гг. // Инфекция и иммунитет. 2021.  
Т. 11, № 4. С. 723–736. doi: 10.15789/2220-7619-EOI-1439

## Citation:

Kurskaya O.G., Anoshina A.V., Leonova N.V., Simkina O.A., Komissarova T.V.,  
Esikova E.Yu., Pozdnyakova L.L., Sobolev I.A., Prokopyeva E.A.,  
Murashkina T.A., Kazachkova E.A., Alekseev A.Yu., Danilenko D.M.,  
Komissarov A.B., Stolyarov K.A., Fadeev A.V., Sominina A.A.,  
Shestopalov A.M., Sharshov K.A. Etiology of influenza-like illnesses in the  
population of Novosibirsk city in the 2018–2019 epidemic season // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4,  
pp. 723–736. doi: 10.15789/2220-7619-EOI-1439

Работы по выделению вируса гриппа в культуре клеток и антигенный анализ выполнены при поддержке гранта РФФ № 19-74-10055.

Influenza virus was isolated from cell culture followed by antigenic analysis supported by the Russian Science Foundation Grant No. 19-74-10055.

были выявлены у 36,4% детей и у 5,8% взрослых, причем у 8,3% детей наблюдалась вирусная коинфекция, в то время как у взрослых случаев коинфекции выявлено не было. Наиболее часто встречающимися вирусами у детей были метапневмовирус — 12,8%, риновирус — 9,3% и респираторно-синцитиальный вирус — 8,0%. У взрослых были выявлены метапневмовирус, аденовирус, вирус парагриппа и риновирус с уровнем детекции не более 2%. В ходе данного исследования нами не было обнаружено различий в частоте выявления вируса гриппа в связи с наличием фоновой патологии, беременности или привычки к курению. В то же время уровень выявления других респираторных вирусов у некурящих пациентов был достоверно ниже, чем у курящих и тех, кто курил ранее (26,15, 66,67 и 62,50% соответственно). Кроме того, уровень детекции респираторных вирусов у детей с хронической патологией был достоверно выше, чем у детей без фоновых состояний (55,3 и 38,7% соответственно). Таким образом, подобные исследования имеют важное значение для отслеживания и контроля инфекции.

**Ключевые слова:** эпидемиология, острые респираторные вирусные инфекции, грипп, гриппоподобные заболевания, этиология ОРВИ, Глобальная сеть по госпитальному надзору за гриппом.

## ETIOLOGY OF INFLUENZA-LIKE ILLNESSES IN THE POPULATION OF NOVOSIBIRSK CITY IN THE 2018–2019 EPIDEMIC SEASON

Kurskaya O.G.<sup>a</sup>, Anoshina A.V.<sup>b</sup>, Leonova N.V.<sup>b</sup>, Simkina O.A.<sup>c</sup>, Komissarova T.V.<sup>c</sup>, Esikova E.Yu.<sup>d</sup>, Pozdnyakova L.L.<sup>d</sup>, Sobolev I.A.<sup>a</sup>, Prokopyeva E.A.<sup>a</sup>, Murashkina T.A.<sup>a</sup>, Kazachkova E.A.<sup>a</sup>, Alekseev A.Yu.<sup>a</sup>, Danilenko D.M.<sup>a</sup>, Komissarov A.B.<sup>a</sup>, Stolyarov K.A.<sup>a</sup>, Fadeev A.V.<sup>a</sup>, Somnina A.A.<sup>a</sup>, Shestopalov A.M.<sup>a</sup>, Sharshov K.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Novosibirsk Children's Municipal Clinical Hospital No. 6, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Novosibirsk Children's Municipal Clinical Hospital No. 3, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>d</sup> Novosibirsk Municipal Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>e</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Influenza and other acute respiratory viral infections lead to a substantial incidence of severe cases and hospitalizations and so remain a global health problem. Within the frame of the Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN), we assessed the contribution of influenza and other respiratory viruses to severe cases of influenza-like diseases in patients hospitalized to the Novosibirsk infectious hospitals in the years 2018–2019. We analyzed 484 nasopharyngeal swabs collected from patients admitted to the hospitals with acute respiratory infections (ARI) using real-time polymerase chain reaction commercial kits. We confirmed viral etiology of ARI in 69.8% cases. Influenza viruses were detected in 47.1% cases, wherein concomitant circulation of influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses was observed in 20.7% and 26% of patients, respectively, whereas influenza B virus was detected only in one sample. All analyzed influenza A viruses were antigenically similar to vaccine strains. Genetically, the Novosibirsk strains were closely related to influenza A viruses distributed in Russia and worldwide. Influenza A(H1N1)pdm09 virus was detected in all patients aged 0 to 14 years and required intensive care. Other respiratory viruses were detected in 36.4% of children and 5.8% of adults, and 8.3% of children had viral coinfection, whereas no cases of coinfection were detected in adults. The most common viruses in children were metapneumovirus — 12.8%, rhinovirus — 9.3% and respiratory syncytial virus — 8.0%. In adults, metapneumovirus, adenovirus, parainfluenza virus and rhinovirus were detected with a detection rate no exceeding 2%. In this study, we found no differences in the detection rate of the influenza virus due to concomitant chronic diseases, pregnancy, or smoking habits. At the same time, the detection rate of other respiratory viruses in non-smokers vs. smokers was significantly lower than in smokers and former smokers (26.15%, 66.67% and 62.50%, respectively). In addition, the level of detection of respiratory viruses in children with vs. without chronic pathology was significantly higher (55.3% and 38.7%, respectively). Thus, our and similar studies are important for monitoring and control of the infection.

**Key words:** epidemiology, acute respiratory infections, influenza, influenza-like illnesses, etiology of ARI, Global Influenza Hospital Surveillance Network.

## Введение

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции, приводя к большому числу госпитализаций, особенно среди детского населения, остаются важной проблемой здравоохранения во всем мире [1]. Тяжесть течения заболевания может варьировать от легкой,

ограниченной поражением верхних отделов респираторного тракта, до тяжелой патологии нижних отделов дыхательной системы, приводящей в некоторых случаях к летальным исходам. Кроме того, грипп может вызывать различные осложнения со стороны других органов и систем: сердечно-сосудистой, центральной нервной [3, 10]. Как правило, тяжелые случаи

заболевания и летальные исходы отмечаются у лиц из групп высокого риска, однако могут наблюдаться в значительной доле и у ранее здоровых субъектов [13]. Для более точной оценки вклада вируса гриппа в развитие тяжелых случаев заболевания необходимы проспективные исследования, проводимые среди госпитализированных пациентов с лабораторно подтвержденными диагнозами [14]. Система эпиднадзора за гриппом имеет важное значение для отслеживания и контроля инфекции, а также для оценки эффективности гриппозных вакцин [12]. «Глобальная сеть по госпитальному надзору за гриппом» (Global Influenza Hospital Surveillance Network, GIHSN) является международной системой, аккумулирующей достоверные эпидемиологические и медицинские данные о влиянии тяжелых форм гриппозной инфекции, требующих госпитализации пациентов, и воздействии гриппозных вакцин на здоровье населения. Данная сеть была создана в 2012 г. и в настоящее время насчитывает 18 стран-участниц, включая Россию [7].

Настоящая работа была выполнена в рамках GIHSN-исследования с целью выяснения значимости различных этиологических агентов в развитии тяжелых форм гриппоподобных заболеваний и других острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), регистрируемых в условиях стационаров г. Новосибирска в 2018–2019 гг.

## Материалы и методы

### Принципы и организация исследования

Исследование было организовано на базе трех инфекционных стационаров города Новосибирска и выполнялось в соответствии с основным протоколом исследования GIHSN. Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФИЦ ФТМ (протокол № 3 от 28.01.2019).

В исследование были включены госпитализированные пациенты всех возрастных групп, отвечающие критериям включения в соответствии с протоколом исследования GIHSN, а именно: госпитализированные не позднее 7 дней от начала заболевания и имеющие хотя бы один из системных симптомов гриппоподобного заболевания (лихорадка, головная боль, миалгия, недомогание) и один из респираторных симптомов (кашель, боль в горле, одышка).

### Взятие образцов

У всех пациентов, участвующих в исследовании, стерильными вискозными тампонами брали назофарингеальный мазок, а также фарингеальный мазок (у больных 14 лет и старше)

или назальный мазок (у детей младше 14 лет) и помещали в пробирку с транспортной средой.

### Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Все полученные образцы использовали для выявления генетического материала вируса гриппа и других респираторных вирусов (респираторно-синцитиального вируса, риновирусов, метапневмовирусов, вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавирусов, аденовирусов групп В, С и Е, бокавирусов) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL», «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL», «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ИнтерЛабСервис, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

### Выделение вируса гриппа и антигенный анализ

Все образцы, в которых методом ПЦР была выявлена РНК вируса гриппа, использовались для выделения изолятов вируса гриппа в культуре клеток MDCK (коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ [15].

Антигенный анализ выделенных изолятов вируса гриппа проводили в реакции торможения гемагглютинации и реакции микронейтрализации с референс-сыворотками, свободно предоставленными ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, по методикам, рекомендованным ВОЗ [15].

### Определение нуклеотидных последовательностей

Определение нуклеотидных последовательностей вирусных геномов было выполнено в ФГБУ НИИ гриппа им. Смородинцева. Экстракция вирусной РНК была выполнена с использованием QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) согласно рекомендациям производителя. Полногеномная амплификация была выполнена одношаговым методом с использованием SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу, предложенному Zhou B. и соавт. [15]. Оценка эффективности амплификации была выполнена посредством электрофореза в агарозном геле. Определение нуклеотидных последовательностей вирусных геномов было выполнено с использованием системы секвенирования нового поколения Illumina MiSeq. Библиотеки для платформы MiSeq были подготовлены с помощью набора Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina,

США). Количественная оценка библиотеки была выполнена с помощью набора NEBNext Library Quant Kit (NEB, Великобритания). Непосредственно для секвенирования был использован MiSeq v2 Reagent Kit (Illumina, США).

#### Филогенетический анализ

Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей (определенных в рамках данной работы, а также представленных в базе данных GISAID) были выполнены посредством программного обеспечения MUSCLE. Построение филогенетических дендрограмм было выполнено в программе MEGA 5.0, с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood) и модели нуклеотидных замен GTR (general time reversible). Для оценки достоверности топологии филогенетических дендрограмм использовалась бутстреп-поддержка (500 репликаций).

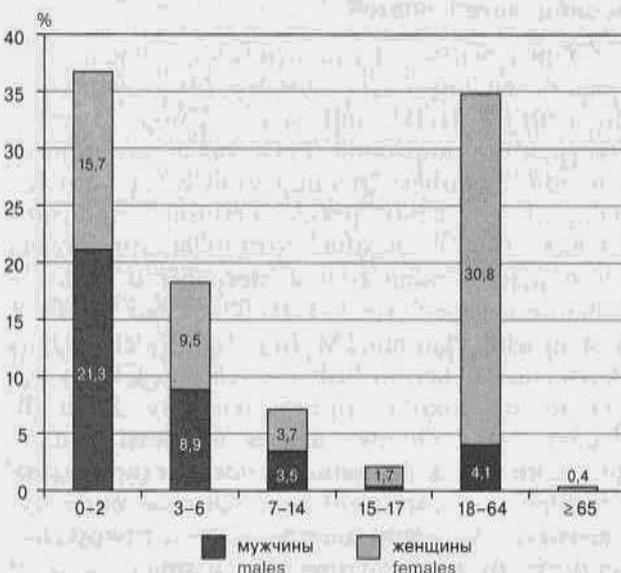
#### Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали с использованием критерия хи-квадрат.

### Результаты

#### Отбор пациентов в соответствии с критериями включения в исследование

В ходе исследования в период сезонной активности гриппа врачами трех инфекционных стационаров г. Новосибирска было отобрано 484 пациента, отвечающих критериям включе-



**Рисунок 1.** Возрастной и половой состав выборки пациентов, включенных в исследование

Figure 1. Age and sex structure of the patient cohort

ния пациентов в исследование. От каждого пациента было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании, после чего были взяты образцы клинического материала. Всего в исследование было включено 313/484 (64,7%) детей в возрасте 0–17 лет и 171/484 (35,3%) взрослых в возрасте 18–70 лет. При этом у детей 165/313 (52,7%) образцов было получено от мальчиков и 148/313 (47,3%) образцов получено от девочек; у взрослых 20/171 (11,7%) образцов было получено от мужчин и 151/171 (88,3%) образцов — от женщин. Среди детей, включенных в исследование, 57,2% (179/313) были в возрасте 0–2 лет. Наименьшее количество образцов было получено от детей 15–17 лет (10 образцов, что составило 3,2% (10/313) от всех образцов, полученных от детей) и от пожилых людей в возрасте старше 65 лет (2 образца, что составило 1,2% (2/171) от образцов, полученных от взрослых пациентов), что было связано с низким уровнем обращаемости пациентов данных возрастных групп в стационары. Половая и возрастная структура выборки представлена на рис. 1.

#### Выявление генетического материала вируса гриппа и других респираторных вирусов методом ПЦР в режиме реального времени

Все полученные образцы были исследованы на наличие генетического материала вируса гриппа типа А и В, респираторно-синцитиального вируса, риновируса, метапневмовируса, вируса парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавируса, аденовируса групп В, С и Е, бокавируса с помощью коммерческих тест-систем. Хотя бы один из перечисленных вирусов был выявлен в 338 образцах из 484 (69,8%), 146 из 484 (30,2%) образцов были отрицательными.

Ведущим этиологическим агентом у госпитализированных пациентов в период с января по апрель 2019 г. являлся вирус гриппа, который определялся в 47,1% случаев (228/484), причем уровень детекции был достоверно выше у взрослых (60,8% [104/171]), чем у детей (39,6% [124/313]) —  $\chi^2 = 20,57$  для  $p < 0,001$ , в то время как другие респираторные вирусы были выявлены у 114/313 (36,4%) детей, что было достоверно чаще, чем у взрослых (10/171 [5,8%]) —  $\chi^2 = 54,25$  для  $p < 0,001$ . При этом у 26/313 (8,3%) детей наблюдалась вирусная коинфекция, из них у 14/313 (4,5%) регистрировали какой-либо респираторный вирус в сочетании с вирусом гриппа, в то время как у взрослых случаев коинфекции выявлено не было.

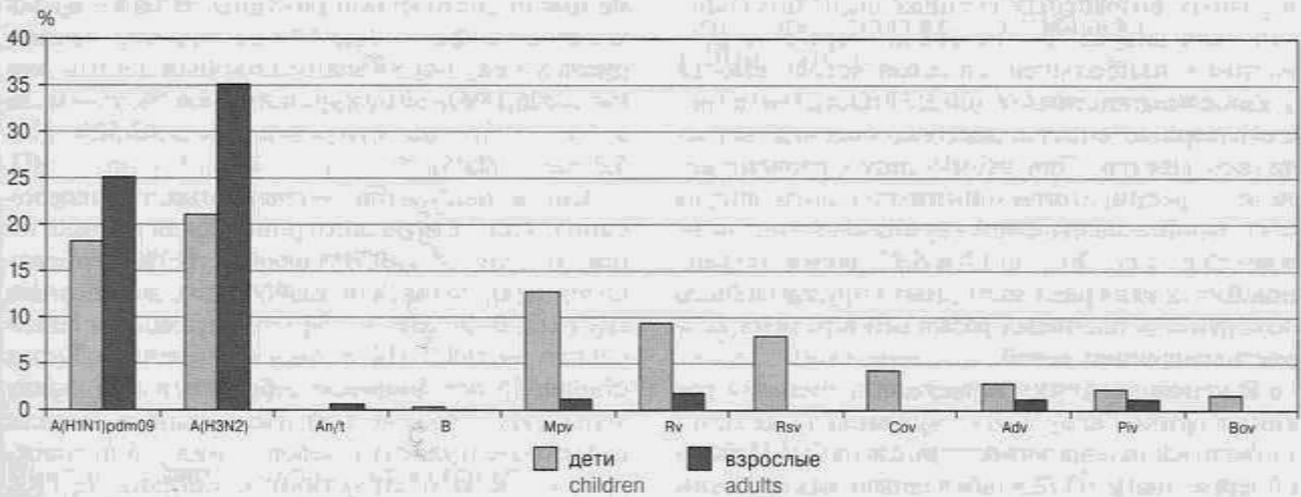
Инфицирование вирусом гриппа типа В было обнаружено только в одном из всех проанализированных случаев (0,4% из всех положительных на грипп проб). Среди вирусов гриппа типа А незначительно превалировал А(Н3N2),

который был выявлен в 55,3% (126/228) всех случаев. Вирус гриппа А(H1N1)pdm09 обнаружен в 43,9% (100/228) случаев. При этом вирус гриппа А(H3N2) достоверно чаще обнаруживался только у взрослых; у детей данные различия не достигали уровня достоверной значимости ни в одной возрастной группе (рис. 2).

Среди других респираторных вирусов у детей наиболее часто встречались метапневмовирус — 12,8% (40/313), риновирус — 9,3% (29/313) и респираторно-синцитиальный вирус — 8,0% (25/313). Остальные респираторные вирусы у детей обнаруживались менее чем в 5% случаев. У взрослых были выявлены только метапневмовирус, аденовирус, вирус парагриппа и риновирус с уровнем детекции не более 2% (рис. 2).

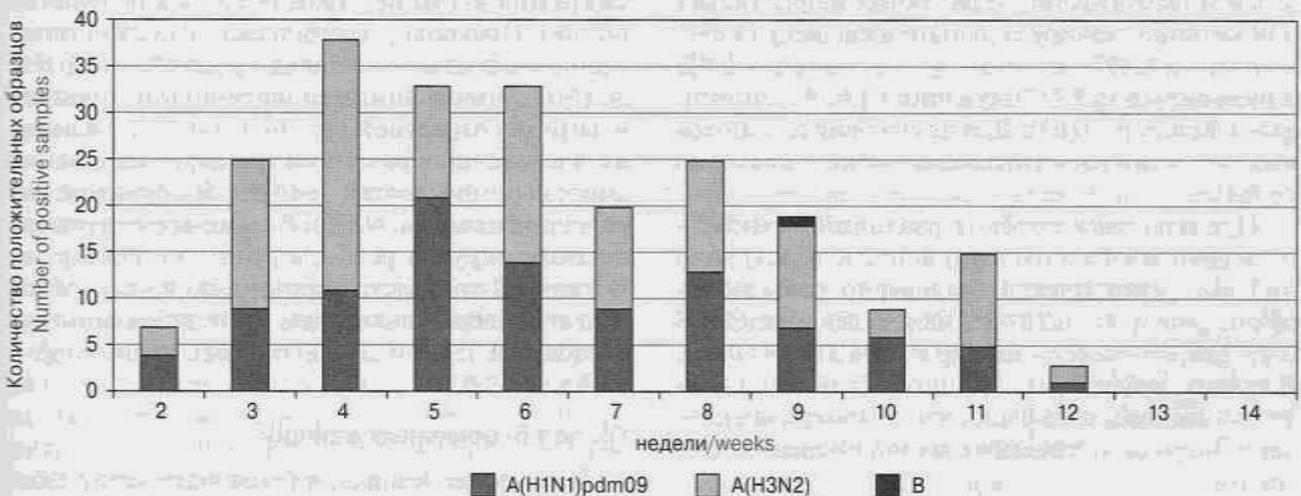
**Сезонная активность гриппа и ОРВИ в г. Новосибирске, 2018–2019 гг.**

В настоящем исследовании вирус гриппа у пациентов, госпитализированных в инфекционные стационары г. Новосибирска, регистрировался со 2-й по 12-ю недели 2019 г. При этом вирусы гриппа субтипов А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) регистрировались в течение всего сезона. Вирус гриппа В был обнаружен только у одного пациента (9-я неделя 2019 г.). Пик активности гриппа пришелся на 4–6-ю неделю 2019 г., когда вирусы гриппа выявлялись у 59,4–80,5% обследованных пациентов. Частота выявления вируса гриппа А(H3N2) была выше по сравнению с А(H1N1)pdm09 в течение всего сезона, за исключением 5-й и 10-й недель, когда уровень детекции вируса



**Рисунок 2. Уровень детекции респираторных вирусов у пациентов в процентах от общего числа обследованных пациентов в каждой группе**

Figure 2. Detection rates of respiratory viruses in patients represented as a percentage of the total number of examined patients in each group



**Рисунок 3. Выявление различных субтипов вируса гриппа в течение сезона 2018–2019 гг.**

Figure 3. Identification of different subtypes of influenza virus in 2018–2019

A(H1N1)pdm09 составил 64 и 67% из всех вирусов гриппа соответственно. Сезонное распределение различных субтипов вируса гриппа представлено на рис. 3.

Среди других респираторных вирусов на протяжении всего периода наблюдения выявлялись метапневмовирус, риновирус и респираторно-синцитиальный вирус. При этом уровень выявления этих вирусов увеличился в период снижения активности вируса гриппа. Остальные вирусы (коронавирус, аденовирус, бокавирус, вирус парагриппа) детектировались менее регулярно в течение сезона.

### Возрастные и половые различия в уровне детекции вируса гриппа и других респираторных вирусов

При сравнении уровня детекции вирусов в разных возрастных группах было показано, что доля вируса гриппа увеличивалась с возрастом с наибольшей частотой встречаемости у взрослого населения (60,8%). Остальные респираторные вирусы достоверно чаще встречались у детей. При этом у детей уровень детекции респираторно-синцитиального вируса был выше в возрастной группе 0–2 года, чем у детей старше 3 лет (10,1 и 5,2% соответственно). Для других респираторных вирусов не было обнаружено значимых различий в разных возрастных группах детей.

В целом различий в частоте выявления респираторных вирусов у мужчин и женщин не было выявлено: вирусы гриппа и ОРВИ были обнаружены у 69,73% обследованных мужчин и у 69,90% женщин. Вирус гриппа детектировали у 43,24% мужчин и 49,5% женщин, что также не имело достоверной разницы ( $\chi^2 = 1,79$  для  $p < 0,05$ ). Вместе с тем уровень детекции других респираторных вирусов в целом был выше у мужчин (35,14%), чем у женщин (24,41%;  $\chi^2 = 6,44$  для  $p < 0,05$ ). Подобные различия наблюдались для метапневмовируса (обнаруживался у 11,89% мужчин и 6,69% женщин,  $\chi^2 = 3,9$  для  $p < 0,05$ ) и риновируса (у 9,73% мужчин и 4,68% женщин,  $\chi^2 = 4,72$  для  $p < 0,05$ ). Для других вирусов половых различий в частоте обнаружения выявлено не было.

При изучении половых различий в возрастных группах было обнаружено, что в группе 0–2 лет вирус гриппа достоверно чаще обнаруживался у мальчиков, чем у девочек (40,78 и 26,32% соответственно,  $\chi^2 = 4,04$  для  $p < 0,05$ ). В других возрастных группах достоверных различий выявлено не было, что в некоторых случаях могло быть связано с малой численностью групп.

Респираторно-синцитиальный вирус в возрастной группе 0–2 лет достоверно чаще обнаруживался у девочек, чем у мальчиков (18,42%

и 3,88% соответственно,  $\chi^2 = 10,22$  для  $p < 0,05$ ). Для остальных респираторных вирусов не было выявлено половых различий в частоте встречаемости в разных возрастных группах.

### Влияние вредных привычек и фоновых заболеваний на уровень детекции вирусов гриппа и других респираторных вирусов

Среди 338 пациентов, у которых методом ПЦР были выявлены вирусы гриппа и других ОРВИ, 314 пациентов никогда не курили, 8 пациентов курили ранее и 16 пациентов курят в настоящее время (для пациентов в возрасте младше 14 лет учитывалась привычка к курению какого-либо из родителей). При этом уровень выявления вируса гриппа у некурящих пациентов составил 47,47%, то есть в 1,4 раза больше, чем у курящих пациентов, что, однако, не имело достоверной разницы. В то же время уровень выявления других респираторных вирусов у некурящих пациентов был достоверно ниже (26,15%), чем у курящих (66,67%,  $\chi^2 = 16,36$  для  $p < 0,05$ ) и тех, кто ранее курил (62,50%,  $\chi^2 = 5,3$  для  $p < 0,05$ ).

Среди пациентов, включенных в исследование, сопутствующая хроническая патология наблюдалась у 47 (9,71% от общего числа обследованных) человек в следующих возрастных группах: 0–2 года — у 34 пациентов, 3–6 лет — у 9 пациентов, 7–14 лет — у 4 пациентов. У лиц старше 15 лет фоновые заболевания не выявлены. Из хронической патологии отмечали сердечно-сосудистые заболевания у 6 человек, хроническую обструктивную болезнь легких, бронхиальную астму и нервно-мышечное заболевание — по 1 пациенту, у 38 человек отмечали другие фоновые заболевания.

У 47 лиц с фоновой патологией вирус гриппа был выявлен в 40,4% случаев, что не имело достоверных различий с уровнем детекции вируса гриппа у лиц без хронических заболеваний (47,8%). Поскольку хроническая фоновая патология была отмечена только у детей в возрасте до 15 лет, мы сравнили аналогичные показатели в данной возрастной группе и также не выявили достоверных различий (уровень выявления вируса гриппа у детей 0–14 лет без фоновой патологии составил 39,1%). В то же время уровень детекции других респираторных вирусов у детей данного возраста с хронической патологией был достоверно выше, чем у детей без фоновых состояний (55,3 и 38,7% соответственно,  $\chi^2 = 4,54$  для  $p < 0,05$ ).

### Грипп у беременных женщин

Всего в исследование была включена 91 беременная женщина в возрасте от 17 до 45 лет. Вирусы гриппа и другие респираторные вирусы были выявлены у 67 (73,63%) пациенток:

у 26 (28,57%) беременных был выявлен вирус гриппа A(H1N1)pdm09, у 35 (38,46%) — A(H3N2), а у 6 (6,6%) — другие респираторные вирусы. При этом не было выявлено достоверных различий в уровне детекции вируса гриппа у беременных женщин по сравнению с небеременными в соответствующих возрастных группах (67,03 и 53,03% соответственно).

#### **Этиология заболеваний у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии**

Всего за время наблюдения госпитализация в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) потребовалась 18 пациентам в возрасте от 0 до 14 лет (3,7% от общего числа включенных в исследование), из них 10 (55,56%) человек относились к возрастной группе 0–2 лет. Ни одному пациенту старше 15 лет не потребовалась госпитализация в ОРИТ. У 88,89% пациентов, госпитализированных в ОРИТ, в качестве этиологического агента был выявлен какой-либо респираторный вирус, в том числе вирус гриппа. При этом у 16,67% пациентов ОРИТ выявили вирусную коинфекцию.

Вирус гриппа был выявлен у 8 (44,44%) пациентов ОРИТ, причем все эти случаи были вызваны вирусом A(H1N1)pdm09. В 16,67% случаев были выявлены респираторно-синцитиальный вирус и метапневмовирус, в 11,11% — риновирус, в 5,56% — вирус парагриппа, аденовирус, коронавирус и бокавирус.

#### **Выделение вируса гриппа в культуре клеток MDCK, антигенные свойства выделенных штаммов**

Все образцы, положительные в ПЦР на грипп, были использованы для выделения вируса гриппа в культуре клеток MDCK. Всего было выделено 58 изолятов вируса гриппа A(H3N2), 81 изолят A(H1N1)pdm09 и 1 изолят вируса гриппа В. Все выделенные изоляты были переданы в ФГБУ НИИ гриппа им. Смородинцева для дальнейших исследований и депонирования в музей вирусов гриппа и ОРЗ.

Для выделенных изолятов были оценены гемагглютинирующие свойства. Для этого была проведена реакция гемагглютинации с эритроцитами петуха, гуся, морской свинки и человека. Было показано, что вирус гриппа В агглютинировал все виды эритроцитов приблизительно в одинаковых титрах (1280–2560 ГАЕ/мл). Среди вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 13,6% изолятов агглютинировали эритроциты петуха в низких титрах (160–320 ГАЕ/мл), в то же время все выделенные изоляты данного субтипа агглютинировали эритроциты гуся (320–1280 ГАЕ/мл), морской свинки (640–2560 ГАЕ/мл) и человека (640–2560 ГАЕ/мл). Ни один изолят вируса

гриппа A(H3N2) не агглютинировал эритроциты петуха и гуся. Кроме того, большинство изолятов этого субтипа агглютинировали только эритроциты морской свинки в низких титрах 80–160 ГАЕ/мл.

Для 20 выделенных изолятов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и 10 изолятов A(H3N2) было оценено антигенное родство с вакцинными штаммами А/Мичиган/45/15 (H1N1)pdm09 и А/Сингапур/INF1МН-16-0019/16 (H3N2) соответственно, предоставленными ФГБУ НИИ гриппа им. Смородинцева. Было показано, что все проанализированные изоляты были близкородственны современному вакцинному штамму: титры сывороток отличались не более чем в 2 раза по сравнению с гомологичными титрами.

#### **Генетический анализ вирусов гриппа, циркулировавших в г. Новосибирске в 2018–2019 гг.**

Генетический анализ был проведен с использованием двух подходов: филогенетического анализа (рис. 4–7) с использованием нуклеотидных последовательностей штаммов, выделенных на территории РФ, и нуклеотидных последовательностей референс-штаммов, для которых уже известны генетические клады и группы, а также сравнительного анализа аминокислотных замен на основе выявления ключевых замен, характерных для различных генетических кладов и групп. Всего было проанализировано 4 штамма A(H1N1)pdm09 и 11 штаммов A(H3N2), циркулировавших в г. Новосибирске в 2018–2019 гг.

По данным филогенетического анализа генов гемагглютинирина и нейраминидазы, а также по наличию ключевых аминокислотных замен (S84N, S162N, I216T, S74R, S164T и I295V в HA1 гемагглютинирина и G77R, V81A и N449D в нейраминидазе) все новосибирские штаммы A(H1N1)pdm09 относились к субкладе 6В.1А клады 6В.1 (рис. 4, 5).

Согласно результатам филогенетического анализа по гену HA (рис. 6), новосибирские штаммы A(H3N2) подразделялись на две филогенетические группы, входившие в субкладу 3С.2alb клады 3С.2a1. Результаты филогенетического анализа подтверждались анализом ключевых аминокислотных замен в HA1 и HA2. Замены K92R, T135K, H311Q в HA1 характерны для H3 HA1 клады 3С.2a1, включающей в себя субклады 3С.2a1a и 3С.2a1b. Во всех рассмотренных штаммах из Новосибирска обнаружены замены K92R и H311Q, но в 3 штаммах из 11 выявлена обратная замена K135T. Замены E62G и R142G в HA1 определяли принадлежность всех 11 штаммов к субкладе 3С.2a1b. Замены T131K и K135T в HA1, а также V200I в HA2

трех штаммов с одной стороны и T128A в HA1 остальных восьми штаммов — с другой определяли разделение всего пула вирусов на две филогенетически различающиеся генетические подгруппы в пределах субклады 3С.2а1b.

Аналогичный результат получен для NA: все штаммы принадлежали субкладе 3С.2а1b (характерные замены K220N, V303I, N329S) и подразделялись на две филогенетические подгруппы.

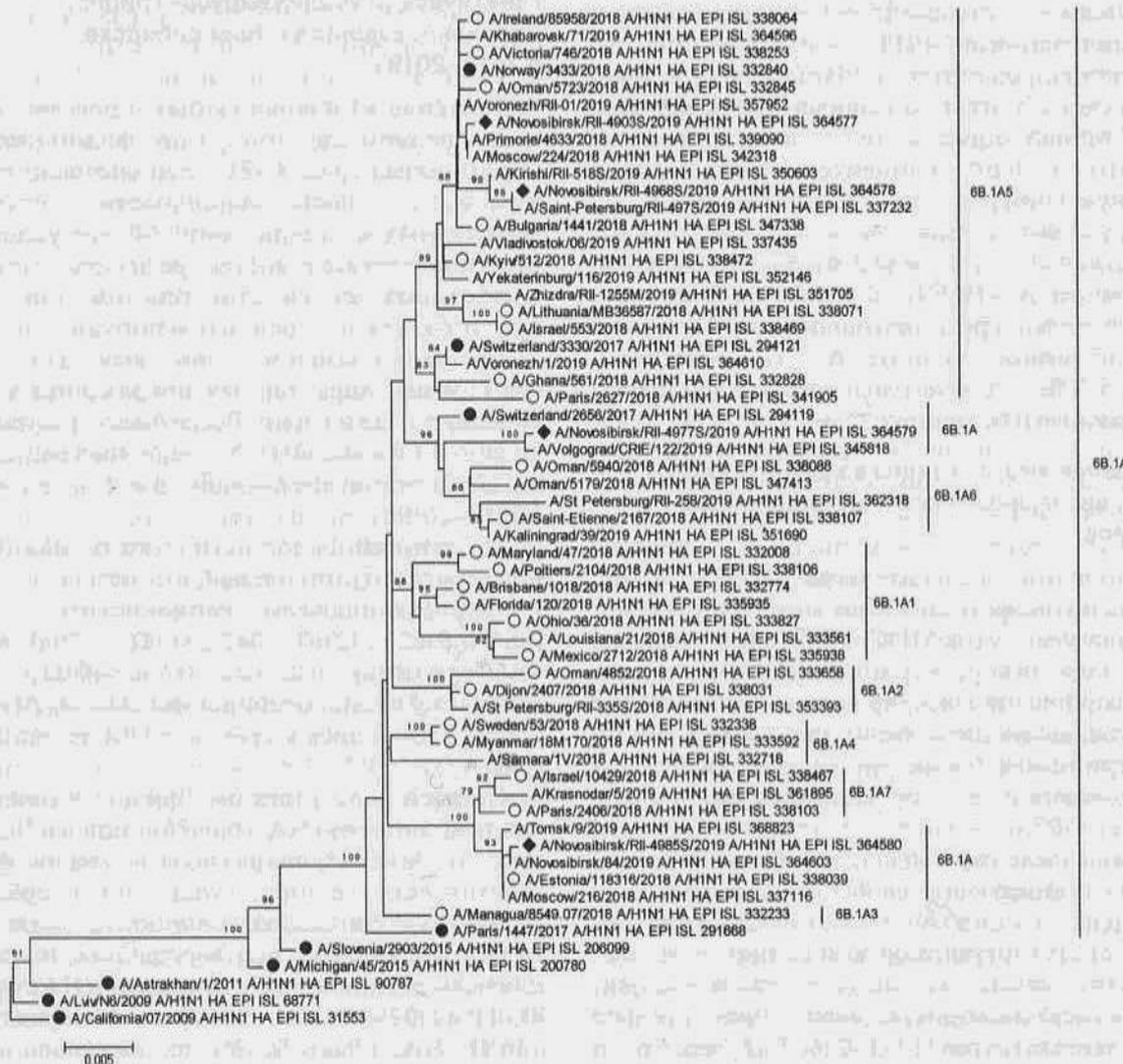
**Устойчивость к антинейраминидазным препаратам**

Согласно информации, опубликованной ВОЗ [17], к настоящему времени в литературе описан широкий спектр мутаций, обуславливающих снижение чувствительности штаммов

вируса гриппа к ингибиторам нейраминидазы. В результате анализа сравнительных множественных выравниваний аминокислотных последовательностей NA штаммов вируса гриппа, выделенных в г. Новосибирске в течение эпидемического сезона 2018–2019 гг., не было обнаружено мутаций, которые, по данным ВОЗ, могут приводить к снижению эффективности существующих антинейраминидазных препаратов.

**Обсуждение**

В рамках исследования GIHSN нами был выполнен анализ этиологической структуры острых респираторных заболеваний у пациентов в возрасте от 0 до 70 лет, госпитали-



**Рисунок 4. Филогенетическая дендрограмма HA вируса гриппа A(H1N1)pdm09**

Figure 4. Phylogenetic analysis of HA-gene of A(H1N1)pdm09 virus

**Примечание.** Ромбы — штаммы, изолированные в Новосибирске. Окружности — референс-штаммы, согласно отчетам ВОЗ (черные), и дополнительные референс-штаммы (белые).

Note. Diamonds denote strains isolated in the city of Novosibirsk; circles — reference strains, according to WHO reports (black), and additional reference strains (white).

зированных в инфекционные стационары г. Новосибирска в течение эпидемического сезона 2018–2019 гг. Вирусная этиология заболевания была подтверждена у 69,8% обследованных пациентов. Ранее в аналогичных исследованиях нами был показан близкий уровень детекции респираторных вирусов у госпитализированных пациентов г. Новосибирска, который составил 72,3% [9]. При этом вирус гриппа встречался наиболее часто и был обнаружен у 47,1% обследованных пациентов. Следует отметить, что вирус гриппа достоверно чаще был выявлен у взрослых по сравнению с детьми (60,8

и 39,6% соответственно). В рамках данного исследования вирус гриппа обнаруживался со 2-й по 12-ю недели 2019 г. с пиком на 4–6-й неделях 2019 г., что согласуется с данными Управления Роспотребнадзора по Новосибирской области, в соответствии с которыми активизация эпидемического сезона по гриппу и ОРВИ отмечалась с 3-й по 9-ю недели 2019 г. с пиком заболеваемости на 5-й неделе [2]. По данным Европейского бюро ВОЗ, пик заболеваемости гриппом в европейском регионе пришелся также на 5-ю неделю 2019 г., когда в 60% образцов был обнаружен вирус гриппа [16]. В нашем ис-

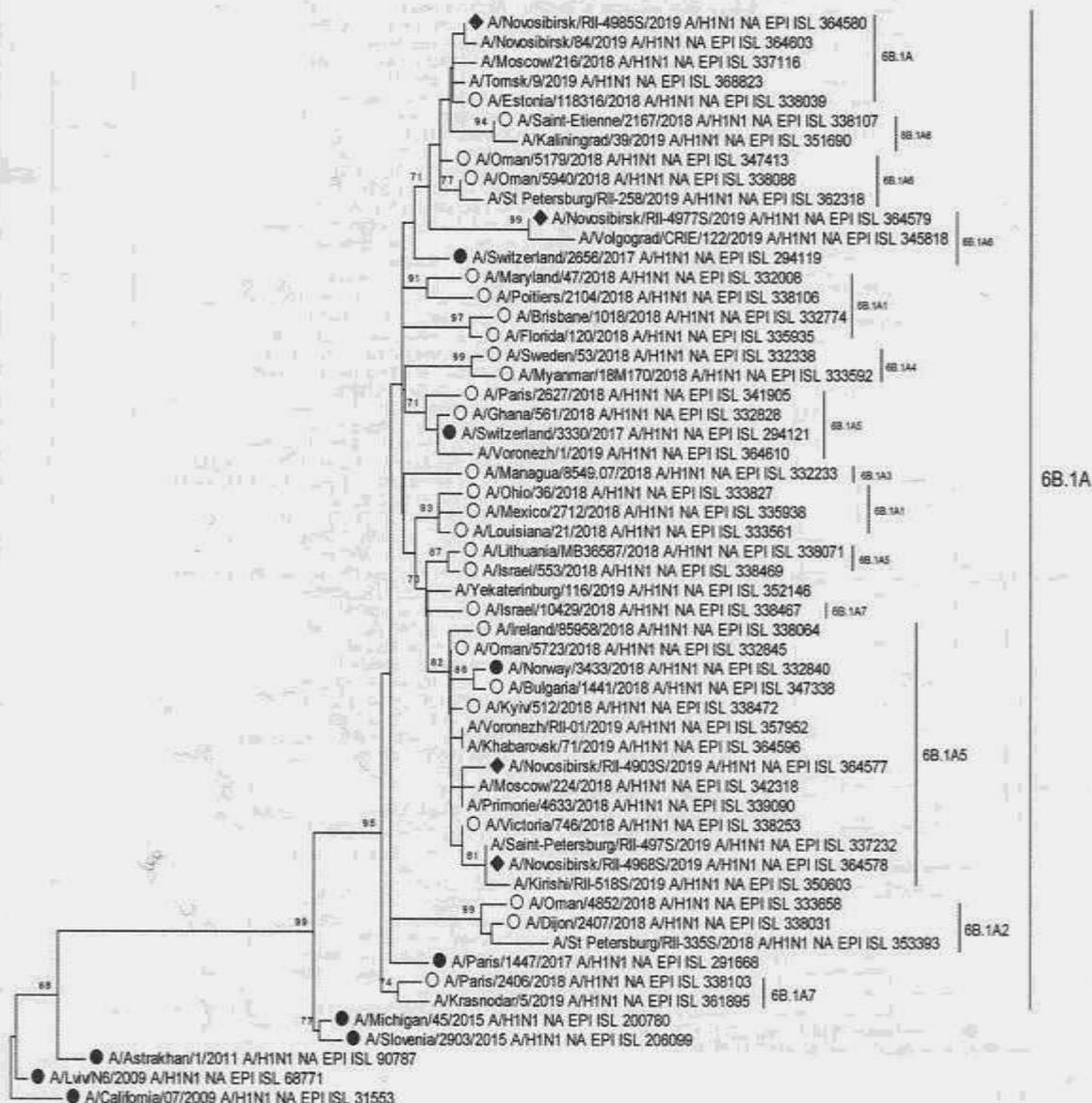


Рисунок 5. Филогенетическая дендрограмма NA вируса гриппа A(H1N1)pdm09

Figure 5. Phylogenetic analysis of NA-gene of A(H1N1)pdm09 virus

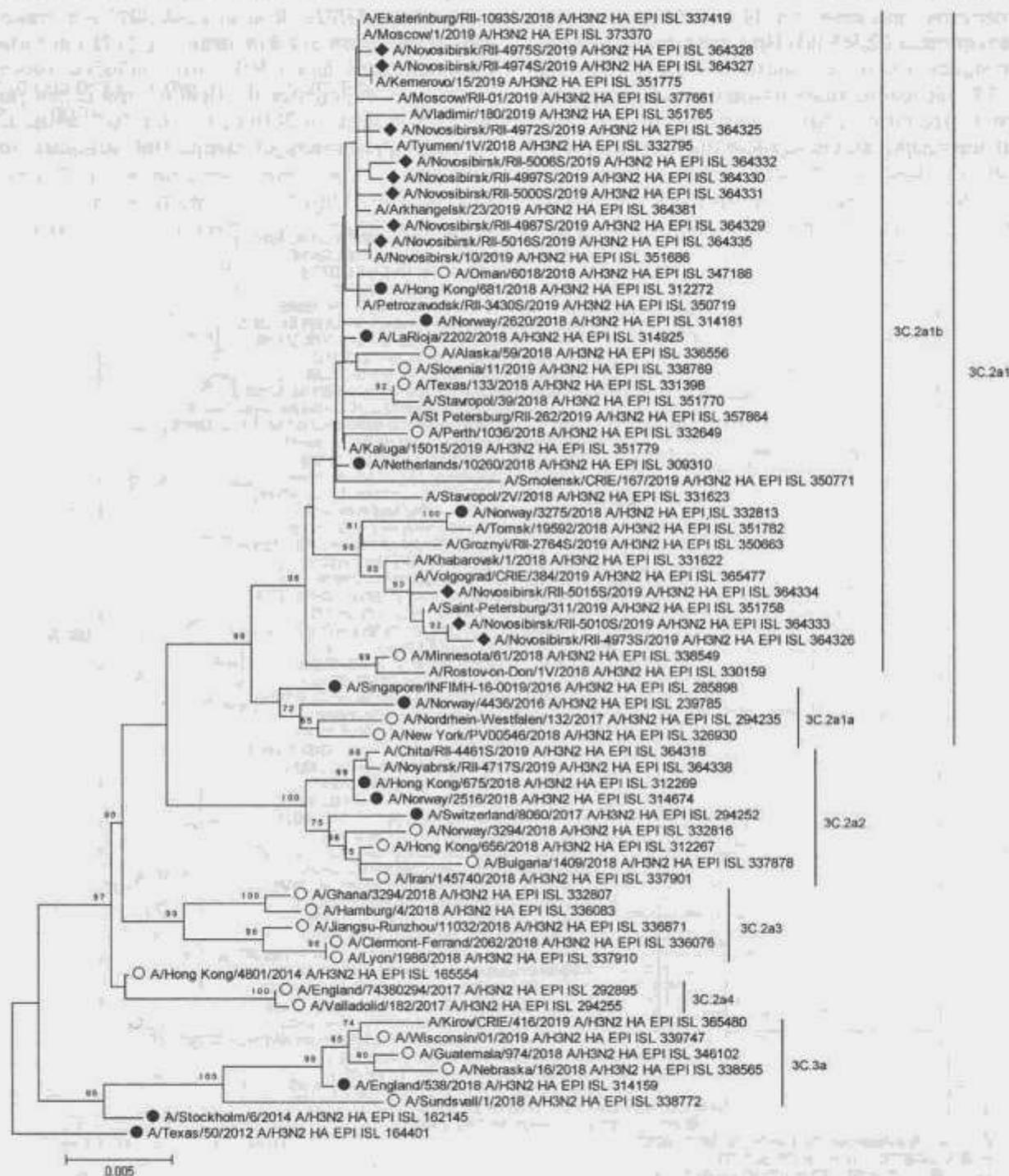
Примечание. Ромбы — штаммы, изолированные в Новосибирске. Окружности — референс-штаммы, согласно отчетам ВОЗ (черные), и дополнительные референс-штаммы (белые).

Note. Diamonds denote strains isolated in the city of Novosibirsk; circles — reference strains, according to WHO reports (black), and additional reference strains (white).

следовании максимальный уровень выявления вируса гриппа составил 80,5% на 5-й неделе 2019 г.

Среди всех выявленных нами вирусов гриппа 99,6% составил вирус гриппа типа А. Аналогичная картина была характерна для всего европей-

ского региона: по данным ВОЗ, 99% циркулировавших вирусов гриппа относились к типу А и только 1% — к вирусу гриппа типа В, однако для некоторых регионов уровень детекции вируса гриппа типа В был несколько выше, и составил 7% для стран Центральной Азии и 5% для



**Рисунок 6. Филогенетическая дендрограмма HA вируса гриппа А(Н3N2)**

Figure 6. Phylogenetic analysis of HA-gene of A(H3N2) virus

**Примечание.** Ромбы — штаммы, изолированные в Новосибирске. Окружности — референс-штаммы, согласно отчетам ВОЗ (черные), и дополнительные референс-штаммы (белые).

**Note.** Diamonds denote strains isolated in the city of Novosibirsk; circles — reference strains, according to WHO reports (black), and additional reference strains (white).

стран Западной Азии [16]. Среди субтипов вируса гриппа А, по данным ВОЗ, в целом наблюдалось незначительное преобладание вируса А(H1N1)pdm09 (57%) по сравнению с А(H3N2) (43%). Однако это соотношение отличалось в различных регионах мира [16]. По данным Управления Роспотребнадзора по Новосибирской области, сезон 2018–2019 гг. характеризовался одновременной циркуляцией вируса гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) [2]. В нашем исследовании также наблюдалась совместная циркуляция

обоих субтипов вируса гриппа А с незначительным преобладанием А(H3N2). При этом, в соответствии с результатами антигенного анализа, все проанализированные нами штаммы вируса гриппа были подобны вакцинным, что, по данным Роспотребнадзора, было характерно в целом для Новосибирской области [2]. Согласно филогенетическому анализу, все проанализированные нами штаммы вируса гриппа А(H1N1)pdm09 принадлежали кладе 6В.1, как и все штаммы, циркулировавшие в Северном

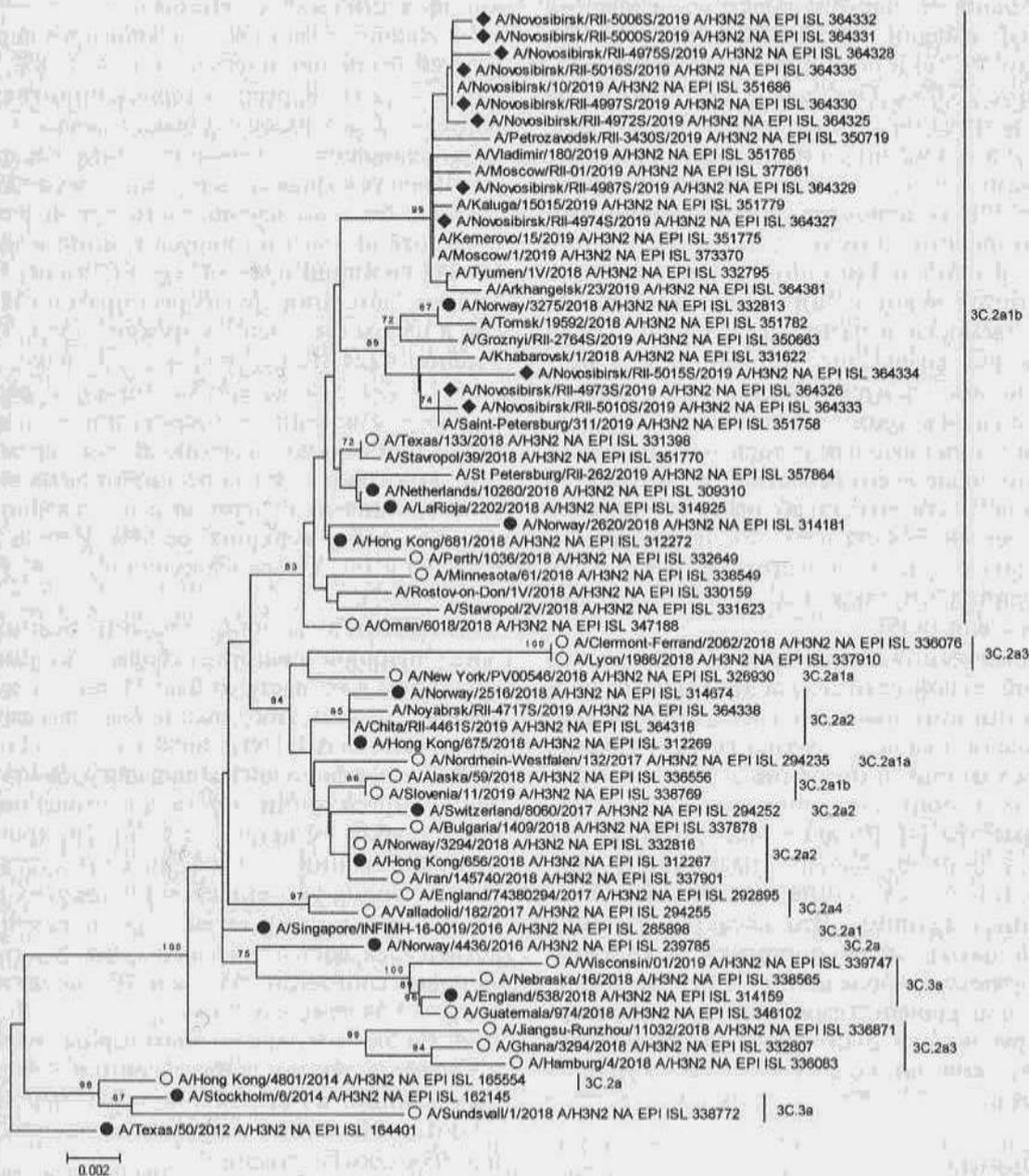


Рисунок 7. Филогенетическая дендрограмма NA вируса гриппа А(H3N2)

Figure 7. Phylogenetic analysis of NA-gene of A(H3N2) virus

Примечание. Ромбы — штаммы, изолированные в Новосибирске. Окружности — референс-штаммы, согласно отчетам ВОЗ (черные), и дополнительные референс-штаммы (белые).

Note. Diamonds denote strains isolated in the city of Novosibirsk; circles — reference strains, according to WHO reports (black), and additional reference strains (white).

полушарии в 2018–2019 гг. [16]. Что касается вируса гриппа А(Н3N2), то все выделенные нами штаммы относились к кладе 3С.2a1b, как и большинство штаммов Северного полушария [17].

Кроме детекции вируса гриппа в данном исследовании выявляли и другие вирусы, вызывающие острые респираторные заболевания. Следует отметить, что процент обнаружения респираторных вирусов у детей был значимо выше, чем у взрослых (36,4 и 5,8% соответственно), что также наблюдалось в различных исследованиях, проводимых ранее в разных странах [1, 6, 8]. У детей наиболее часто в нашем исследовании мы обнаруживали метапневмовирус (12,8%), риновирус (9,3%) и респираторно-синцитиальный вирус (8,0%). Остальные респираторные вирусы встречались менее чем в 5% случаев. При этом в аналогичном исследовании, проводимом нами ранее, было показано, что в период с 2013 по 2017 гг. наиболее распространенными респираторными вирусами у детей были вирус гриппа, респираторно-синцитиальный вирус и риновирус с некоторыми отличиями в частоте встречаемости в разные сезоны [9]. Также наблюдались возрастные особенности в распространении некоторых вирусов: так, уровень детекции вируса гриппа увеличивался с возрастом, в то время как респираторно-синцитиальный вирус чаще всего регистрировался у детей раннего возраста, что также было обнаружено нами ранее [9]. Вместе с тем мы не обнаружили половых различий в частоте встречаемости вируса гриппа, что также наблюдалось другими исследователями [5].

В исследованиях, проводимых ранее в рамках «Глобальной сети по госпитальному надзору за гриппом», было показано, что беременность увеличивала вероятность заболевания гриппом у женщин, особенно если у них была хотя бы одна сопутствующая патология в первом триместре [4]. В нашем исследовании мы не обнаружили достоверных различий в уровне детекции вируса гриппа у беременных и небеременных женщин. Что касается влияния фоновой патологии и привычки к курению на вероятность заболевания ОРВИ, было выявлено, что уровень выявления респираторных вирусов был достоверно выше у детей с хронической патологией, а также у курящих пациентов.

## Заключение

1. Вирусная этиология заболеваний была подтверждена у 69,8% обследованных пациентов, госпитализированных с симптомами ОРВИ. При этом в целом уровень детекции вирусов у детей (71,6%) и взрослых (66,7%) не имел достоверной разницы ( $\chi^2 = 1,26$  для  $p < 0,05$ ).

2. Уровень детекции вируса гриппа составил 47,1%, причем он был достоверно выше у взрослых (60,8%), чем у детей (39,6%) ( $\chi^2 = 20,57$  для  $p < 0,001$ ). Вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 выявлен в 20,7% исследованных образцов, а вирус гриппа А(Н3N2) — в 26%. Вирус гриппа В выявлен только в одном образце.

3. Другие респираторные вирусы были выявлены достоверно чаще у детей (36,4%), чем у взрослых (5,8%) ( $\chi^2 = 54,25$  для  $p < 0,001$ ). При этом у 8,3% детей наблюдалась вирусная коинфекция, в то время как у взрослых случаев коинфекции выявлено не было.

4. Наиболее часто встречающимися вирусами у детей были метапневмовирус — 12,8%, риновирус — 9,3% и респираторно-синцитиальный вирус — 8,0%. У взрослых были выявлены только метапневмовирус, аденовирус, вирус парагриппа и риновирус с уровнем детекции не более 2%.

5. Не было отмечено достоверной разницы в частоте выявления вируса гриппа у мужчин (43,24%) и женщин (49,5%) ( $\chi^2 = 1,79$  для  $p < 0,05$ ). Уровень детекции других респираторных вирусов в целом был выше у мужчин (35,14%), чем у женщин (24,41%) ( $\chi^2 = 6,44$  для  $p < 0,05$ ).

6. Не было отмечено достоверной разницы в уровне выявления вируса гриппа в зависимости от привычки к курению. В то же время уровень выявления других респираторных вирусов у некурящих пациентов был достоверно ниже (26,15%), чем у курящих (66,67%,  $\chi^2 = 16,36$  для  $p < 0,05$ ) и тех, кто ранее курил (62,50%,  $\chi^2 = 5,3$  для  $p < 0,05$ ).

7. Госпитализация в отделение реанимации и интенсивной терапии требовалась пациентам с гриппом в возрасте от 0 до 14 лет; во всех подобных случаях заболевание было вызвано вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09.

8. У лиц с фоновой патологией уровень выявления вируса гриппа не имел достоверной разницы с уровнем детекции у лиц без хронических заболеваний (40,4 и 47,8% соответственно). В то же время уровень детекции других респираторных вирусов у детей с хронической патологией был достоверно выше, чем у детей без фоновых состояний (55,3 и 38,7% соответственно,  $\chi^2 = 4,54$  для  $p < 0,05$ ).

9. Не было выявлено достоверных различий в уровне детекции вируса гриппа у беременных женщин по сравнению с небеременными в соответствующих возрастных группах (67,03 и 53,03% соответственно).

10. Все проанализированные штаммы вируса гриппа А, выделенные в ходе исследования, были подобны вакцинным штаммам. По структуре сегментов, кодирующих поверхностные гликопротеины, штаммы были генетически родственны вариантам вируса гриппа А, распространенным в России и в мире.

## Благодарности

Сбор материала, выявление генетического материала респираторных вирусов, определение нуклеотидных последовательностей виру-

са гриппа выполнены в рамках исследования GISHN. Работы по выделению вируса гриппа в культуре клеток и антигенный анализ выполнены при поддержке гранта РФФ № 19-74-10055.

## Список литературы/References

1. Львов Н.И., Писарева М.М., Мальцев О.В., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Михайлова М.А., Го А., Янина М.А., Резниченко Н.А., Грудинин М.П., Жданов К.В., Лобзин Ю.В. Особенности этиологической структуры ОРВИ в отдельных возрастных и профессиональных группах населения Санкт-Петербурга в эпидемический сезон 2013–2014 гг. // Журнал инфектологии. 2014. Т. 6, № 3, С. 62–70. [Lvov N.I., Pisareva M.M., Maltsev O.V., Buzitskaya J.V., Afanasieva V.S., Mikhailova M.A., Go A., Yanina M.A., Reznichenko N.A., Grudin M.P., Zhdanov K.V., Lobzin Y.V. The features of ARVD etiological structure in different age and professional population groups in Saint-Petersburg during 2013–2014 epidemic season. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2014, vol. 6, no. 3, pp. 62–70. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2014-6-3-62-70
2. Роспотребнадзор. Итоги прошлого эпидсезона гриппа (2018–2019 гг.) и прогноз на новый сезон 2019–2020 гг. [Russian Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Well-being (Rospotrebnadzor). About the results of the epidemic season of influenza (2018–2019), forecast for the 2019–2020 epidemic season. (In Russ.)] URL: <http://41.rospotrebnadzor.ru/content/itogi-proshlogo-epidsezona-grippa-2018-2019-gg-i-prognoz-na-novyy-sezon-2019-2020-gg> (12.02.2021)
3. Asha K., Kumar B. Emerging influenza D virus threat: what we know so far! *J. Clin. Med.*, 2019, vol. 8, no. 2: 192. doi: 10.3390/jcm8020192
4. Baselga-Moreno V., Trushakova S., McNeil S., Sominina A., Nunes M.C., Draganescu A., Unal S., Koul P., Kyncl J., Zhang T., Kuatbayeva A., Ben-Salah A., Burtseva E., Puig-Barberà J., Diez-Domingo J. for the Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN). Influenza epidemiology and influenza vaccine effectiveness during the 2016–2017 season in the Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN). *BMC Public Health*, 2019, no. 19: 487. doi: 10.1186/s12889-019-6713-5
5. Dong W., Chen Q., Hu Y., He D., Liu J., Yan H. Epidemiological and clinical characteristics of respiratory viral infections in children in Shanghai, China. *Arch. Virol.*, 2016, no. 161, pp. 1907–1913. doi: 10.1007/s00705-016-2866-z
6. Feng L., Li Z., Zhao S., Nair H., Lai S., Xu W., Li M., Wu J., Ren L., Liu W., Yuan Z., Chen Y., Wang X., Zhao Z., Zhang H., Li F., Ye X., Li S., Feikin D., Yu H., Yang W. Viral etiologies of hospitalized acute lower respiratory infection patients in China, 2009–2013. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 6: e99419. doi: 10.1371/journal.pone.0099419
7. Global Influenza Hospital Surveillance Network. The Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN). *GIHSN*, 2018. 11 p.
8. Ju X., Fang Q., Zhang J., Xu A., Liang L., Ke C. Viral etiology of influenza-like illnesses in Huizhou, China, from 2011 to 2013. *Arch. Virol.*, 2014, vol. 159, no. 8, pp. 2003–2010. doi: 10.1007/s00705-014-2035-1
9. Kurskaya O., Ryabichenko T., Leonova N., Shi W., Bi H., Sharshov K., Kazachkova E., Sobolev I., Prokopyeva E., Kartseva T., Alekseev A., Shestopalov A. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized children in Novosibirsk City, Russia (2013–2017). *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 9: e0200117. doi: 10.1371/journal.pone.0200117
10. McCauley J.W., Hongo S., Kaverin N.V., Kochs G., Lamb R.A., Matrosovich M.N., Perez D.R., Palese P., Presti R.M., Rimstad E. Virus taxonomy. In: Classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. by King A.M.Q., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. *San Diego: Elsevier Academic Press*, 2012, pp. 749–761.
11. Ortiz J.R., Neuzil K.M., Shay D.K., Rue T.C., Neradilek M.B., Zhou H., Seymour C.W., Hooper L.G., Cheng P.Y., Goss C.H., Cooke C.R. The burden of influenza-associated critical illness hospitalizations. *Crit. Care Med.*, 2014, vol. 42, no. 11, pp. 2325–2332. doi: 10.1097/ccm.0000000000000545
12. Puig-Barberà J., Mira-Iglesias A., Burtseva E., Cowling B.J., Serhat U., Ruiz-Palacios G.M., Launay O., Kyncl J., Koul P., Siqueira M.M., Sominina A.; Global Influenza Hospital Surveillance Network Influenza epidemiology and influenza vaccine effectiveness during the 2015–2016 season: results from the Global Influenza Hospital Surveillance Network. *BMC Infect. Dis.*, 2019, vol. 19: 415. doi: 10.1186/s12879-019-4017-0
13. Puig-Barberà J., Tormos A., Sominina A., Burtseva E., Launay O., Ciblak M.A., Natividad-Sancho A., Buigues-Vila A., Martínez-Úbeda S., Mahé C.; GIHSN Group. First-year results of the Global Influenza Hospital Surveillance Network: 2012–2013 Northern hemisphere influenza season. *BMC Public Health*, 2014, vol. 14: 564. doi: 10.1186/1471-2458-14-564
14. Puig-Barberà J., Tormos A., Trushakova A., Sominina A., Pisareva M., Ciblak M.A., Badur S., Yu H., Cowling B.J., Burtseva E., on behalf of the GIHSN Group. The Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN): a new platform to describe the epidemiology of severe influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2015, vol. 9, no. 6, pp. 277–286. doi: 10.1111/irv.12335
15. WHO. Guidelines for pharmacological management of pandemic influenza A (H1N1) 2009 and other influenza viruses. Revised February 2010. Part I. Recommendations. *WHO*, 2010. 32 p.
16. WIC, WHO CC for Reference and Research on Influenza, FCI. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccines for the Southern Hemisphere 2020. 23<sup>rd</sup> – 26<sup>th</sup> September 2019. *WIC, WHO CC for Reference and Research on Influenza, FCI*, 2019. 149 p.
17. Zhou B., Lin X., Wang W., Halpin R.A., Bera J., Stockwell T.B., Barr I.G., Wentworth D.E. Universal Influenza B virus genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 5, pp. 1330–1337. doi: 10.1128/jcm.03265-13

**Авторы:**

**Курская О.Г.**, к.м.н., старший научный сотрудник отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия;

**Аношина А.В.**, к.м.н., зав. инфекционным отделением ГБУЗ НО Детская городская клиническая больница № 6, г. Новосибирск, Россия;

**Леонова Н.В.**, главный врач ГБУЗ НО Детская городская клиническая больница № 6, г. Новосибирск, Россия;

**Симкина О.А.**, врач-эпидемиолог ГБУЗ НО Детская городская клиническая больница № 3, г. Новосибирск, Россия;

**Комиссарова Т.В.**, к.м.н., главный врач ГБУЗ НО Детская городская клиническая больница № 3, г. Новосибирск, Россия;

**Есикова Е.Ю.**, врач-инфекционист ГБУЗ НО Городская инфекционная клиническая больница № 1, г. Новосибирск, Россия;

**Позднякова Л.Л.**, к.м.н., заслуженный врач РФ, главный врач ГБУЗ НО Городская инфекционная клиническая больница № 1, г. Новосибирск, Россия;

**Соболев И.А.**, к.б.н., научный сотрудник ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия;

**Прокопьева Е.А.**, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия;

**Мурашкина Т.А.**, младший научный сотрудник ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия;

**Казачкова Е.А.**, младший научный сотрудник ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия;

**Алексеев А.Ю.**, к.б.н., старший научный сотрудник, руководитель лаборатории моделирования и мониторинга инфекционных процессов, ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия;

**Даниленко Д.М.**, к.б.н., зам. директора по научной работе, руководитель отдела этиологии и эпидемиологии, ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Комиссаров А.Б.**, зав. лабораторией молекулярной вирусологии, ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Столяров К.А.**, ведущий программист ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Фадеев А.В.**, научный сотрудник, ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Соминина А.А.**, к.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ, ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Шестопапов А.М.**, д.б.н., профессор, зав. отделом экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний, ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия;

**Шаршов К.А.**, к.б.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией разработки и испытания фармакологических средств, ФГБНУ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Россия.

**Authors:**

**Kurskaya O.G.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Experimental Modelling and Pathogenesis of Infectious Diseases, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation;

**Anoshina A.V.**, PhD (Medicine), Head of the Department of Infectious Diseases, Novosibirsk Children's Municipal Clinical Hospital No. 6, Novosibirsk, Russian Federation;

**Leonova N.V.**, Head Physician, Novosibirsk Children's Municipal Clinical Hospital No. 6, Novosibirsk, Russian Federation;

**Simkina O.A.**, Epidemiologist, Novosibirsk Children's Municipal Clinical Hospital No. 3, Novosibirsk, Russian Federation;

**Komissarova T.V.**, PhD (Medicine), Head Physician, Novosibirsk Children's Municipal Clinical Hospital No. 3, Novosibirsk, Russian Federation;

**Esikova E.Yu.**, Infectologist, Novosibirsk Municipal Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation;

**Pozdnyakova L.L.**, PhD (Medicine), Honored Physician of the Russian Federation, Head Physician of Novosibirsk Municipal Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation;

**Sobolev I.A.**, PhD (Biology), Researcher, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation;

**Prokopyeva E.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation;

**Murashkina T.A.**, Junior Researcher, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation;

**Kazachkova E.A.**, Junior Researcher, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation;

**Alekseev A.Yu.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Experimental Modelling and Pathogenesis of Infectious Diseases, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation;

**Danilenko D.M.**, PhD (Biology), Deputy Director for Science Work, Head of the Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Komissarov A.B.**, Head of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Stolyarov K.A.**, Leading Programmist, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Fadееv A.V.**, Researcher, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Sominina A.A.**, PhD (Medicine), Professor, Honoured Scientist of the Russian Federation, Head of the Laboratory for Studying Risk Factors of Influenza and Acute Respiratory Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Shestopalov A.M.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Experimental Modelling and Pathogenesis of Infectious Diseases, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation;

**Sharshov K.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Developing and Drug Testing, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation.

# СТРУКТУРА СООБЩЕСТВА ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* В РОТОГЛОТКЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

А.Д. Воропаев<sup>2</sup>, Д.А. Екатеринчев<sup>2</sup>, Ю.В. Несвижский<sup>2</sup>, В.В. Зверев<sup>2</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>, Е.В. Волчкова<sup>2</sup>, М.С. Афанасьев<sup>2</sup>, Е.В. Буданова<sup>2</sup>, Р.Е. Бошнян<sup>2</sup>, Е.И. Лиханская<sup>1</sup>, Ю.Н. Урбан<sup>1</sup>, М.Э. Сулейманова<sup>2</sup>, В.А. Воропаева<sup>2</sup>, Ю.С. Филина<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 г. Москвы, Москва, Россия

**Резюме.** В настоящее время практически отсутствует информация о структуре сообщества грибов рода *Candida*, способных становиться этиологическим фактором кандидозного поражения ВИЧ-инфицированных пациентов. Цель работы — исследование структуры сообщества грибов рода *Candida*, колонизирующих ротоглотку ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза. Проведено микробиологическое исследование ротоглотки 31 ВИЧ-инфицированного пациента (51,6% мужчин и 48,4% женщин) с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, проходивших стационарное лечение в КИБ № 2 г. Москвы в период 2015–2017 гг. В ходе исследования мы подтвердили разнообразие видов грибов рода *Candida*, обнаруживаемых в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов. Всего было выделено 52 изолята грибов рода *Candida*, среди которых преобладали *C. albicans* (57,7%). Из non-*albicans* видов с наибольшей частотой встречались *C. glabrata* (21,1%). «Минорные» компоненты были представлены *C. tropicalis* (11,5%) и *C. krusei* (9,6%). *C. albicans* и *C. glabrata* были чувствительны к полиенам, а минорные компоненты сообщества — к Итраконазолу и Клотримазолу. Подавляющее число штаммов были резистентны к Флуконазолу. Было обнаружено, что сообщество грибов рода *Candida* имеет определенную архитектуру. Микроб может присутствовать в биотопе ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов как монокультура и как ассоциация: гомогенная, состоящая из штаммов одного вида, или гетерогенная, образованная несколькими видами. У 18 пациентов (58,1%) грибы рода *Candida* были выделены в виде монокультуры, а у 13 (41,9%) — в форме ассоциаций, сформированных 34 изолятами (65,4% от общего числа), из которых 16 (30,8%) были выделены из гомогенных ассоциаций и 18 (34,6%) — из гетерогенных. Двухкомпонентных ассоциаций было 9 (69,2%), а состоявших из трех и более компонентов — 4 (30,8%). Оказалось, что архитектура рассматриваемого сообщества во многом определяется его видовым составом, что подтверждает ранее полученные данные. Наиболее часто образовывали ассоциации *C. krusei* (100%) и *C. albicans* (73,3%). При этом *C. albicans* чаще всего (72,7%)

## Адрес для переписки:

Несвижский Юрий Владимирович  
119991, Россия, Москва, ул. Трубетская, 8/2, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России.  
Тел.: 8 (916) 889-88-75.  
E-mail: nesviz@mail.ru

## Contacts:

Yuri V. Nesvizhsky  
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8/2, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.  
Phone: +7 (916) 889-88-75.  
E-mail: nesviz@mail.ru

## Для цитирования:

Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Несвижский Ю.В., Зверев В.В., Афанасьев С.С., Волчкова Е.В., Афанасьев М.С., Буданова Е.В., Бошнян Р.Е., Лиханская Е.И., Урбан Ю.Н., Сулейманова М.Э., Воропаева В.А., Филина Ю.С. Структура сообщества грибов рода *Candida* в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 737–744. doi: 10.15789/2220-7619-TSO-1450

## Citation:

Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Nesvizhsky Yu.V., Zverev V.V., Afanasiev S.S., Volchkova E.V., Afanasiev M.S., Budanova E.V., Boshjan R.E., Likhanskaya E.I., Urban Y.N., Suleymanova M.E., Voropaeva V.A., Filina Yu.S. The structure of the oropharyngeal genus *Candida* fungi community in HIV-infected patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet. 2021, vol. 11, no. 4, pp. 737–744. doi: 10.15789/2220-7619-TSO-1450

формировали гомогенный тип ассоциаций. Чувствительность грибов рода *Candida* к антимикотическим препаратам зависела также от архитектуры их сообщества. Так, *C. albicans* в условиях гетерогенных ассоциаций проявляла широкий спектр резистентности.

**Ключевые слова:** грибы рода *Candida*, структура микробного сообщества, архитектура микробного сообщества, ВИЧ-инфицированные пациенты, орофарингеальный кандидоз, антимикотикорезистентность.

## THE STRUCTURE OF THE OROPHARYNGEAL GENUS *CANDIDA* FUNGI COMMUNITY IN HIV-INFECTED PATIENTS

Voropaev A.D.<sup>a</sup>, Yekaterinchev D.A.<sup>b</sup>, Nesvizhsky Yu.V.<sup>b</sup>, Zverev V.V.<sup>b</sup>, Afanasiev S.S.<sup>a</sup>, Volchkova E.V.<sup>b</sup>, Afanasiev M.S.<sup>b</sup>, Budanova E.V.<sup>b</sup>, Boshjan R.E.<sup>b</sup>, Likhanskaya E.I.<sup>a</sup>, Urban Y.N.<sup>a</sup>, Suleymanova M.E.<sup>b</sup>, Voropaeva V.A.<sup>b</sup>, Filina Yu.S.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Gabrachevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *The Infectious Hospital No. 2 of the city of Moscow, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** At the present time virtually no data are available about the structure of the genus *Candida* fungus able to target HIV-infected patients and serve as an etiological factor of candidiasis. The aforementioned shaped the aim of the study: to examine structure of the *Candida* genus community colonizing the oropharynx in HIV-infected patients with clinical manifestations of oropharyngeal candidiasis. There was conducted a microbiological study of the oropharynx in 31 HIV-infected patients (51.6% males and 48.4% females) with clinical manifestations of oropharyngeal candidiasis treated at Moscow Infectious Clinic No. 2 inpatient department in the years 2015–2017. We confirmed the diversity of the oropharyngeal *Candida* spp. community found in HIV-infected patients. Total 52 isolates of the genus *Candida* were isolated. *C. albicans* dominated in 57.7% cases, whereas *C. glabrata* prevailed (21.1%) among non-*albicans* species. Minor components were represented by *C. tropicalis* (11.5%) and *C. krusei* (9.6%). *C. albicans* and *C. glabrata* were sensitive to polyenes, whereas minor community components — to itraconazole and clotrimazole. The vast majority of fungal strains were resistant to fluconazole. The genus *Candida* community reveals a unique architecture so that any member may exist in the oropharyngeal biotope of HIV-infected patients as a monoculture or in association: homogeneous, consisting of a single species strains, or heterogeneous, formed by several species. *Candida* fungi in 18 patients (58.1%) were isolated as a monoculture, whereas in 13 (41.9%) subjects — in association consisting of 34 isolates (65.4% of total number), of which 16 (30.8%) and 18 (34.6%) were isolated from homogeneous and heterogeneous associations, respectively. There were identified 9 two-component associations (69.2%), and 4 (30.8%) consisting of three or more components. It turned out that pattern of the examined community was mainly determined by species composition that agrees with previous data. Most common associations were presented by *C. krusei* (100%) and *C. albicans* (73.3%). Upon that, most often *C. albicans* (72.7%) formed a homogeneous type of associations. Sensitivity of *Candida* fungi to antimycotic drugs also depended on the architecture of related community. *C. albicans* isolates in heterogeneous associations revealed a wide range of resistance acquired by contact with non-*albicans* species.

**Key words:** fungi of the genus *Candida*, structure of the microbial community, architectonics of the microbial community, HIV-infected patients, oropharyngeal candidiasis, antimycotic resistance.

## Введение

Кандидозное поражение тканей и органов при ВИЧ-инфекции, к которому относится орофарингеальный кандидоз, — закономерный этап развития прогрессирующего иммунодефицитного состояния, связанного с поражением системы общего и местного (локального) иммунитета. Кандидоз обусловлен массивным разрастанием популяции грибов рода *Candida* на поверхности слизистых ротоглотки, что становится заметно невооруженным глазом [15]. Сегодня известно о разнообразии видового спектра грибов рода *Candida*, которые могут одновременно паразитировать организм ВИЧ-инфицированного пациента [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21,

22]. Однако практически отсутствует информация о структуре сообщества этих грибов у данного контингента пациентов.

Ранее было показано, что микробиом желудочно-кишечного тракта имеет определенную структурную упорядоченность [1]. В частности, большинство микробов, как в пристеночной области, так и в фекалиях, формируют устойчивые ассоциации, компонентный состав которых зависит от их анатомической локализации. В то же время сведений об архитектуре сообщества грибов рода *Candida*, обнаруживаемых у ВИЧ-инфицированных пациентов с орофарингеальным кандидозом, немного, хотя известно, что данные грибы могут выделяться в виде коизолятов [10, 19].

Вышеуказанное определило цель настоящей работы: исследование структуры сообщества грибов рода *Candida*, колонизирующих ротоглотку ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза.

Полученные данные могут иметь важное клиническое значение, в том числе для выбора адекватной антимикотической терапии.

## Материалы и методы

Проведено микробиологическое исследование ротоглотки 31 ВИЧ-инфицированного пациента с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза, находившегося на стационарном лечении в КИБ № 2 г. Москвы в период 2015–2017 гг. (13 человек в 2015 г., 18 человек в 2017 г.), из них 51,6% мужчин и 48,4% женщин (медиана возраста составила 38 лет). Возраст пациентов колебался от 20 до 69 лет, 65% составили лица от 20 до 40 лет, как среди женщин, так и среди мужчин. Срок наблюдения за пациентами, к моменту обследования составил в среднем 6 лет с колебаниями от 1 года до 18 лет.

У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на использование данных лабораторных анализов в научных целях. Все исследования проведены с согласия Комитета по этике при ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 25.04.2014) на основании требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г.

ВИЧ-инфекция у всех пациентов была диагностирована на основании клинико-эпидемиологических данных и подтверждена обнаружением специфических антител/антигенов методом иммуноферментного анализа и лизантного иммунного блоттинга (ИБ) к белкам вируса иммунодефицита человека (Profiblot 48 [TECAN, Швейцария], AutoBlot 3000 [Bio-Rad, США]). Стадия ВИЧ-инфекции устанавливалась в соответствии с клинической классификацией ВИЧ-инфекции по Покровскому В.И. (2001) в модификации 2006 г. [3]. У подавляющего большинства пациентов (77,4%) диагностирована стадия 4В, у 9,7% — 4А, у 9,7% — 4Б и у 3,2% — 3 (субклиническая).

Всем пациентам, включенным в исследование, было проведено стандартное клинико-лабораторное обследование, в том числе определение маркеров вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции, уровня РНК ВИЧ в сыворотке кро-

ви и показателей иммунного статуса, включая количество CD4 клеток/мкл, CD4%, CD8 клеток/мкл, CD8%, CD4/8. Среднее количество CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов на момент включения пациентов в исследование составило 265 клеток/мкл, из них данный показатель был менее 350 клеток/мкл у 83,9% лиц, менее 50 клеток/мкл — у 32,2%. Уровень иммунорегуляторного индекса у всех обследованных пациентов CD4/8 был меньше 1,5, что является показателем высокого риска возникновения оппортунистических инфекций.

Для выделения культур *Candida* spp. образцы мазков из ротоглотки, полученные у ВИЧ-инфицированных пациентов, засеивали на кровяной агар при помощи тампона, материалы инкубировались в термостате 24 ч при температуре 37°C. Затем производили пересев на селективную среду Сабуро № 2 при помощи микробиологической петли и инкубировали в термостате 24 ч при температуре 37°C. Полученные изоляты культивировались на хромогенном агаре для грибов *Candida* (HiMedia, Индия) в термостате 24 ч при температуре 37°C, а затем производилась ориентировочная дифференцировка грибов по цвету колоний согласно инструкции к дифференциальной среде.

Идентификация проводилась путем микроскопии мазков из культур, окрашенных по Граму, по биохимическим свойствам с помощью коммерческих тест-систем (Remel, Erba Lachema, Чехия) и мультиплексной ПЦР с видоспецифическими праймерами (АмплиСенс, Россия). Выделенные чистые культуры *Candida* spp. хранили на скошенном агаре Сабуро в пробирках при температуре 4–6°C.

Для экстракции ДНК использовали наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией. Экстракцию ДНК из каждого клинического образца проводили в присутствии внутреннего контрольного образца — ВКО-FL. При использовании форм выпуска набора 4–7 применяли входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Амплификацию с флуоресцентной детекцией проводили в режиме реального времени с помощью комплекта реагентов «ПЦР-комплект» (вариант FRT-100 F).

Подробная информация о процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования, а также по анализу и интерпретации изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК воз-

будителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией» [2].

Чувствительность к антимикотическим препаратам определяли стандартным диско-диффузионным методом. Использовали бумажные диски (Oxoid, Великобритания) диаметром 6 мм, пропитанные антимикотическими препаратами, и плотную питательную среду Мюллера–Хинтон, содержащую 2% глюкозы и 0,5 мкг/мл красителя метиленового синего. Для приготовления инокулюма использовали суточные культуры исследуемых *Candida* spp. Мутность инокулюма соответствовала 0,5 ед. по Мак-Фарланду ( $1 \times 10^6$ – $5 \times 10^6$  клеток/мл).

Посев инокулюма проводили не позднее чем через 15 минут с момента его приготовления. Стерильный хлопковый тампон несколько раз погружали в инокулюм, затем переносили в чашку Петри со средой Мюллера–Хинтон и растирали по всей поверхности среды, постепенно вращая тампон для получения роста «газоном» и полного впитывания инокулюма в среду.

Диски с антимикотическими препаратами наносили стерильным пинцетом на поверхность засеянной чашки, слегка придавливая для получения наибольшей площади соприкосновения со средой. Инкубировали при температуре 35°C 18–24 ч. Учет результатов проводили по диаметру зоны задержки роста.

Результаты исследования подвергали стандартной статистической обработке с помощью программы Statistica 6.0. Использовали непараметрические методы: Манна–Уитни и хи-квадрат Пирсона. Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину  $p < 0,05$  [4].

## Результаты

Из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орально-фарингеального кандидоза было выделено 52 изолята грибов рода *Candida*, среди которых доминирующее положение занимали *C. albicans* (57,7%) (табл. 1). Из non-albicans видов с наибольшей частотой встречалась *C. glabrata* (50,0%, или 21,1% от общего числа). Минорные компоненты были представлены *C. tropicalis* (27,3%, или 11,5% от общего числа) и *C. krusei* (22,7%, или 9,6% от общего числа). Корреляционный анализ показал, что *C. albicans* устойчиво конкурировала в биотопе ротоглотки с *C. glabrata* ( $r = -0,573$ ) и совокупностью минорных компонентов ( $r = 0,829$ ).

У 18 пациентов (58,1%) грибы рода *Candida* были выделены в виде монокультуры, а у 13 (41,9%) — в форме ассоциаций. Последние были сформированы 34 изолятами (65,4% от общего числа), из которых 16 (30,8%) были выделены

**Таблица 1. Частота выявления и видовой спектр грибов рода *Candida* в ротоглотке ВИЧ-инфицированных пациентов**

Table 1. Frequency of detection and species spectrum of *Candida* fungi in oropharyngeal of HIV-infected patients

Виды грибов Fungi species	Всего Total	Монокультура Monoculture		Ассоциации Association					
				Всего Total		Гомогенные Homogeneous		Гетерогенные Heterogeneous	
		абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
<i>C. albicans</i>	30	8	26,7	22	73,3	16	53,3	6	20,0
<i>C. glabrata</i>	11	7	63,6	4	36,4	0	0,0	4	36,4
<i>C. tropicalis</i>	6	3	50,0	3	50,0	0	0,0	3	50,0
<i>C. krusei</i>	5	0	0,0	5	100,0	0	0,0	5	100,0
Итого Total	52	18	34,6	34	65,4	16	30,8	18	34,6
В том числе <i>C. non-albicans</i> Including <i>C. non-albicans</i>	22	10	45,5	12	54,5	0	0,0	12	54,5
В том числе минорные компоненты сообщества Including minor components of the community	11	3	27,3	8	72,7	0	0,0	8	72,7

из гомогенных ассоциаций и 18 (34,6%) — гетерогенных. Двухкомпонентных ассоциаций было 9 (69,2%), а состоявших из трех и более компонентов — 4 (30,8%).

В целом сообщества *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* существенно различались между собой по архитектуре ( $p < 0,01$ ). Выделенные виды грибов рода *Candida* с разной частотой образовывали ассоциации. Наиболее выражено это было в сообществе *C. krusei* (100%) и *C. albicans* (73,3%), что существенно отличало их от *C. glabrata* (36,4%,  $p < 0,05$ ). В то же время *C. tropicalis* практически не отличалась по данной характеристике от остальных видов.

Анализ характера ассоциаций показал, что *C. albicans* чаще всего образуют ассоциации гомогенного типа (72,7%). Остальные виды грибов формировали только гетерогенные ассоциации, что существенно отличало сообщество *C. non-albicans* от *C. albicans* ( $p < 0,001$ ).

Выделенные из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов грибы рода *Candida* были исследованы на чувствительность к основным группам антимикотических препаратов (табл. 2). В соответствии с полученными данными наиболее эффективными оказались препараты полиенового ряда, в том чис-

ле Нистатин (90,4%), наименьшей эффективностью отличались триазолы, в том числе Флуконазол (23,1%). Детальный анализ выявил межвидовые различия. Так, Нистатин был наиболее эффективен в отношении *C. albicans* и *C. glabrata*. *C. tropicalis* оказались чрезвычайно чувствительны к Итраконазолу (100%), а *C. krusei* — к Итраконазолу и Клотримазолу (по 80,0%). Резистентность к Флуконазолу наиболее часто регистрировалась у *C. albicans* (23,3%) и *C. tropicalis* (40,0%). *C. glabrata* были слабо чувствительны к Итраконазолу (9,1%), а *C. krusei* — к Кетоконазолу и Флуконазолу (по 40,0%). Тем не менее среди выделенных видов грибов рода *Candida* мы не обнаружили изолятов, полирезистентных к препаратам азолового ряда или даже панрезистентных. В целом исследованные изоляты, в том числе группа *C. non-albicans*, статистически не различались по спектру чувствительности к тестируемым антимикотическим препаратам. В то же время минорные компоненты изучаемого сообщества в совокупности были более чувствительны к Итраконазолу (90,9%).

Анализ зависимости чувствительности к антимикотическим препаратам от архитектуры сообщества грибов рода *Candida* обнаружил опре-

**Таблица 2. Эффективность антимикотических препаратов различных фармакологических групп в отношении *Candida* spp., выделенных из ротоглотки**

Table 2. Effectiveness of antimycotic medicines of different pharmacological groups in relation to *Candida* spp., isolated from the oropharyngea

Виды грибов Fungi species	Имидазолы Imidazole				Триазолы Triazole				Полиены Polyenes			
	Кетоконазол Ketoconazole		Клотримазол Clotrimazole		Итраконазол Itraconazole		Флуконазол Fluconazole		Нистатин Nystatin		Амфотерицин В Amphotericin B	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<i>C. albicans</i>	16	53,3	18	60,0	10	33,3	7	23,3	29	96,7	24	80,0
<i>C. glabrata</i>	6	54,5	4	36,4	1	9,1	3	27,3	11	100,0	5	45,5
<i>C. tropicalis</i>	4	66,7	5	83,3	6	100,0	0	0,0	4	66,7	4	66,7
<i>C. krusei</i>	2	40,0	4	80,0	4	80,0	2	40,0	3	60,0	3	60,0
Итого Total	28	53,8	31	59,6	21	40,4	12	23,1	47	90,4	36	69,2
В том числе <i>C. non-albicans</i> Including <i>C. non-albicans</i>	12	54,5	13	59,1	11	50,0	5	22,7	18	81,8	12	54,5
В том числе минорные компоненты сообщества Including minor components of the community	6	54,5	9	81,8	10	90,9	2	18,2	7	63,6	7	63,6

деленные межвидовые различия. Так, *C. albicans* во всех формах организации сообщества были чувствительны к полиенам, и, в частности, к Нистатину, а резистентны к Флуконазолу. При этом *C. albicans*, выделенные из гомогенных ассоциаций, проявили минимальную чувствительность к Флуконазолу, а из гетерогенных — сразу к трем препаратам: Клотримазолу, Итраконазолу и Флуконазолу.

Все изоляты *C. glabrata* были также чувствительны к Нистатину. Но их монокультуры были чрезвычайно устойчивы к Итраконазолу и Амфотерицину В, а изоляты, выделенные из ассоциаций, — к Флуконазолу и Клотримазолу. Как монокультуры, так и образующие ассоциации *C. tropicalis* были в 100% случаев резистентны к Флуконазолу, но чувствительны к Итраконазолу. Помимо этого, все монокультуры *C. tropicalis* угнетались имидазолами.

Сравнение монокультур *C. albicans* и *C. glabrata* показало их существенное различие по чувствительности к амфотерицину В (соответственно 100 и 28,6%,  $p < 0,01$ ). Выделенные из гетерогенных ассоциаций изоляты *C. albicans* и *C. krusei* значительно различались по чувствительности к Клотримазолу и Итраконазолу (в обоих случаях соответственно 16,7 и 80,0%,  $p < 0,01$ ).

## Обсуждение

В ходе исследования микотической части микробиоты ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями орофарингеального кандидоза мы подтвердили разнообразие видов грибов рода *Candida*, вовлеченных в патогенез заболевания, и доминирующую позицию *C. albicans* [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22]. При этом было обнаружено, что сообщество грибов данного рода имеет разнообразную архитектуру. Микроб может присутствовать в биотопе ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов как монокультура или ассоциация коизолятов, что согласуется с ранее полученными данными [10, 19] и подтверждает ранее выдвинутый тезис об определенной структурной организации микробных сообществ, населяющих биотопы тела человека [1]. Мы показали, что указанные ассоциации могут быть не только гетерогенными, состоящие из грибов различных видов, но и гомогенными, включающими только один вид. Кроме того, оказалось, что архитектура рассматриваемого сообщества во многом определяется его видовым составом. Наибольшую склонность к формированию ассоциаций имели *C. albicans*

и *C. krusei*. При этом именно *C. albicans* чаще образует гомогенный тип.

В ходе исследования мы установили видовую зависимость чувствительности грибов рода *Candida* к антимикотическим препаратам. При этом явным фаворитом по эффективности в отношении *C. albicans* и *C. glabrata* были полиены, в том числе Нистатин, а для вторичных компонентов сообщества — Клотримазол и Итраконазол. Бесспорно наилучшим препаратом для всех исследованных изолятов оказался Флуконазол. Факт распространения приобретенной устойчивости к азолам, особенно в популяции ВИЧ-инфицированных пациентов, отмечается многими исследователями [6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 20, 21].

Примечательно, что архитектура сообщества грибов рода *Candida* в значительной степени определяла чувствительность к антимикотическим препаратам. Так, *C. albicans* в условиях гетерогенных ассоциаций проявляет широкий спектр резистентности. Для *C. glabrata* этот эффект был менее выражен.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. грибы рода *Candida* присутствуют в биотопе ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов с симптомами орофарингеального кандидоза в виде монокультуры или ассоциаций: гомогенных или гетерогенных;

2. наиболее часто образуют ассоциации *C. albicans* и *C. krusei*, при этом *C. albicans* чаще формирует ассоциации гомогенного типа;

3. чувствительность грибов рода *Candida* к антимикотическим препаратам зависит от архитектуры сообщества;

4. изоляты *C. albicans*, выделенные из гетерогенных ассоциаций, обладают мультирезистентностью к препаратам азолового ряда.

Установленные факты еще раз указывают на необходимость тщательного подбора антимикотических средств для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов. Кроме того, обнаруженная в ходе исследования гетерогенность грибов рода *Candida*, высеваемых из ротоглотки ВИЧ-инфицированных пациентов, по видовому составу, структуре сообщества и чувствительности к антимикотическим препаратам позволила нам предположить, что орофарингеальный кандидоз нельзя рассматривать как результат внутрибольничного инфицирования, которое должно вести к закономерной синхронизации характеристик исследуемого микробного сообщества в популяции пациентов, а грибы рода *Candida* не несут эпидемической опасности.

## Список литературы/References

1. Богданова Е.А., Несвижский Ю.В. Архитектоника микробного сообщества желудочно-кишечного тракта // Вестник РАМН. 2010. № 11. С. 38–42. [Bogdanova E.A., Nesvizhsky Yu.V. Architectonics of gastrointestinal microbial community. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, no. 11, pp. 38–42. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-6-311-319
2. Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией: методические рекомендации. М.: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. 138 с. [Examining of clinical material for DNA of sexually transmitted infections and other reproductive organs infections pathogens by hybrid fluorometric PCR: methodological recommendations. Moscow: Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2006. 138 p. (In Russ.)]
3. Инструкция по заполнению годовой формы федерального государственного статистического наблюдения № 61 «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией»: приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 17 марта 2006 г. № 166. [Completion guidelines for the annual federal state statistical survey form No. 61 “Data on HIV-infected patients cohorts”: a supplement for Order No. 166 on 17.03.2006 of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation. (In Russ.)] URL: <https://base.garant.ru/12145892> (15.11.2020)
4. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1975. 295 с. [Urbach V.Yu. Statistical analysis in biological and medical research. Moscow: Medicine, 1975. 295 p. (In Russ.)]
5. Шевяков М.А. Антибиотик-ассоциированная диарея и кандидоз кишечника: возможности лечения и профилактики // Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т. 49, № 10. С. 26–29. [Shevyakov M.A. Antibiotic-associated diarrhea and candidiasis of an intestine: possibilities of treatment and prophylaxis. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2004, vol. 49, no. 10, pp. 26–29. (In Russ.)]
6. Ambe N.F., Longdoh N.A., Tebid P., Bobga T.P., Nkfusai C.N., Ngwa S.B., Nsai F.S., Cumber S.N. The prevalence, risk factors and antifungal sensitivity pattern of oral candidiasis in HIV/AIDS patients in Kumba District Hospital, South West Region, Cameroon. *Pan. Afr. Med. J.*, 2020, vol. 36: 23. doi: 10.11604/pamj.2020.36.23.18202
7. Awoyeni A., Olaniran O., Odetoyin B., Hassan-Olajokun R., Olopade B., Afolayan D., Adekunle O. Isolation and evaluation of *Candida* species and their association with CD4<sup>+</sup> T cells counts in HIV patients with diarrhea. *Afr. Health Sci.*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 322–329. doi: 10.4314/ahs.v17i2.5
8. Berkow E.L., Lockhart S.R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect. Drug Resist.*, 2017, no. 10, pp. 237–245. doi: 10.2147/IDR.S118892
9. Bhattacharya S., Sae-Tia S., Fries B.C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 6: 312. doi: 10.3390/antibiotics9060312
10. Clark-Ordóñez I., Callejas-Negrete O.A., Aréchiga-Carvajal E.T., Mouriño-Pérez R.R. *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. *Med. Mycol.*, 2017, vol. 55, no. 3, pp. 285–294. doi: 10.1093/mmy/myw069
11. Cleveland A.A., Farley M.M., Harrison L.H., Stein B., Hollick R., Lockhart S.R., Magill S.S., Derado G., Park B.J., Chiller T.M. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 55, no. 10, pp. 1352–1361. doi: 10.1093/cid/cis697
12. Cleveland A.A., Harrison L.H., Farley M.M., Hollick R., Stein B., Chiller T.M., Lockhart S.R., Park B.J. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 3: e0120452. doi: 10.1371/journal.pone.0120452
13. Enoch D.A., Yang H., Aliyu S.H., Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods Mol. Biol.*, 2017, no. 1508, pp. 17–65. doi: 10.1007/978-1-4939-6515-1\_2
14. Goulart L.S., Souza W.W.R., Vieira C.A., Lima J.S., Olinda R.A., Araújo C. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. *Einstein (Sao Paulo)*, 2018, vol. 16, no. 3: eAO4224. doi: 10.1590/S1679-45082018AO4224
15. Gow N.A., Brown A.J., Odds F.C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, vol. 5, pp. 366–371. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00338-7
16. Hager C.L., Ghannoum M.A. The mycobiome in HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2018, vol. 1, no. 13, pp. 69–72. doi: 10.1097/COH.0000000000000432
17. Jung I.Y., Jeong S.J., Kim Y.K., Kim H.Y., Song Y.G., Kim J.M., Choi J.Y. A multicenter retrospective analysis of the antifungal susceptibility patterns of *Candida* species and the predictive factors of mortality in South Korean patients with candidemia. *Medicine (Baltimore)*, 2020, vol. 99, no. 11: e19494. doi: 10.1097/MD.00000000000019494
18. Lamichhane K., Adhikari N., Bastola A., Devkota L., Bhandari P., Dhungel B., Thapa Shrestha U., Adhikari B., Banjara M.R., Rijal K.R., Ghimire P. Biofilm-producing *Candida* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients attending Sukraraj Tropical and Infectious Diseases Hospital in Kathmandu, Nepal. *HIV AIDS (Auckl.)*, 2020, no. 12, pp. 211–220. doi: 10.2147/HIV.S255698
19. Olson M.L., Jayaraman A., Kao K.C. Relative ABUNDANCES of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in in vitro coculture biofilms impact biofilm structure and formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, vol. 84, no. 8: e02769-17. doi: 10.1128/AEM.02769-17
20. Osaigbovo I.I., Lofor P.V., Oladele R.O. Fluconazole resistance among oral *Candida* isolates from people living with HIV/AIDS in a Nigerian Tertiary Hospital. *J. Fungi (Basel)*, 2017, vol. 3, no. 4: 69. doi: 10.3390/jof3040069

21. Pfaller M.A., Rhomberg P.R., Messer S.A., Jones R.N., Castanheira M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2015, vol. 82, no. 4, pp. 303–313. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.008
22. Spalanzani R.N., Mattos K., Marques L.I., Barros P.F.D., Pereira P.I.P., Paniago A.M.M., Mendes R.P., Chang M.R. Clinical and laboratorial features of oral candidiasis in HIV-positive patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2018, vol. 51, no. 3, pp. 352–356. doi: 10.1590/0037-8682-0241-2017

**Авторы:**

**Воропаев А.Д.**, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Екатеринчев Д.А.**, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Несвижский Ю.В.**, д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Зверев В.В.**, академик РАН, д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Афанасьев С.С.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Волчкова Е.В.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Афанасьев М.С.**, д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Буданова Е.В.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Бошняк Р.Е.**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Лиханская Е.И.**, к.б.н., руководитель лаборатории микробиологии и профилактики кишечных инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Урбан Ю.Н.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Сулейманова М.Э.**, студентка ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Воропаева В.А.**, студентка ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия;

**Филина Ю.С.**, к.м.н., врач-инфекционист ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 2 г. Москвы, Москва, Россия.

**Authors:**

**Voropaev A.D.**, PhD Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Yekaterinchev D.A.**, PhD Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Nesvizhsky Yu.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Zverev V.V.**, RAS Full Member, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Afanasyev S.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

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

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

**Budanova E.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Boshjan R.E.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Likhanskaya E.I.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology and Prophylaxis of Intestinal Infections, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Urban Y.N.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Suleymanova M.E.**, Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Voropaeva V.A.**, Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Filina Yu.S.**, PhD (Medicine), Infectologist, The Infectious Hospital No. 2 of the city of Moscow, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.04.2020  
Отправлена на доработку 23.05.2020  
Принята к печати 15.07.2021

Received 08.04.2020  
Revision received 23.05.2020  
Accepted 15.07.2021

# ПРОГНОЗ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Л.В. Кравченко

ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** Цель исследования — изучить особенности экспрессии костимуляторных молекул CD28, CD40 при активации Т- и В-лимфоцитов и разработать прогностический алгоритм диагностики тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей. *Материалы и методы.* Иммунологическое исследование включало изучение Т- и В-лимфоцитов периферической крови с помощью проточной цитофлуориметрии: CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD4, CD8, CD20, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, CD28, CD40. Результаты теста учитывали на лазерном проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Epics XL. В ходе проводимого исследования было выделено две группы новорожденных в зависимости от степени тяжести цитомегаловирусной инфекции: 1 группа — тяжелая форма ЦМВИ — 60 человек (45,1%); 2 группа — среднетяжелая форма ЦМВИ — 73 человека (54,9%). *Результаты.* Получены статистически значимые данные в отношении влияния величины В-лимфоцитов, В-лимфоцитов с рецепторами костимуляции CD40, Т-хелперов и Т-лимфоцитов без рецепторов костимуляции CD28 на прогноз тяжелой формы ЦМВИ. В 1 группе пациентов выявлен иммунологический дисбаланс, свидетельствующий об истощении адаптивных механизмов: он способствует длительной персистенции вируса и развитию тяжелой формы ЦМВИ. С помощью метода «деревья классификации» нам удалось разработать дифференцированный подход к прогнозу тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей. Были получены системы неравенств, четыре из которых классифицируют подгруппу новорожденных с тяжелым течением цитомегаловирусной инфекции. Последовательное применение полученных неравенств позволяет выделить из входного потока больных пациентов с прогнозом развития тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции. При помощи ROC-анализа диагностической ценности вышеуказанного метода прогноза тяжелой формы ЦМВИ было показано, что информативность используемых иммунологических параметров характеризуется как «отличная», о чем свидетельствует площадь под кривой (AUC — 0,974). Предложенный диагностический алгоритм можно использовать для прогноза тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных, что делает возможным своевременное начало специфической терапии.

**Ключевые слова:** новорожденные, цитомегаловирусная инфекция, Т-лимфоциты, нарушения активации.

## PROGNOSIS OF SEVERE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN NEWBORNS

Kravchenko L.V.

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

**Abstract.** Objective is to study the features of impaired activation of T and B lymphocytes in order to predicting severe cytomegalovirus infection in newborns. *Materials and methods.* 133 newborns with cytomegalovirus infection were examined. Immediately after diagnosing cytomegalovirus infection, all patients observed were immunologically ex-

### Адрес для переписки:

Кравченко Лариса Вахтанговна  
344012, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43,  
ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский  
университет Минздрава России.  
Тел.: 8 (863) 201-14-88 (служебн.), 8 918 853-88-94 (моб.).  
E-mail: larakra@list.ru

### Contacts:

Larisa V. Kravchenko  
344012, Russian Federation, Rostov-on-Don, Mechnikov str., 43,  
Rostov State Medical University.  
Phone: +7 (863) 201-14-88 (office), +7 918 853-88-94 (mobile).  
E-mail: larakra@list.ru

### Для цитирования:

Кравченко Л.В. Прогноз тяжелой формы цитомегаловирусной  
инфекции у новорожденных детей // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11,  
№ 4. С. 745–751. doi: 10.15789/2220-7619-POS-1537

### Citation:

Kravchenko L.V. Prognosis of severe cytomegalovirus infection in newborns //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021,  
vol. 11, no. 4, pp. 745–751. doi: 10.15789/2220-7619-POS-1537

aminated, including assessing count of peripheral blood T and B lymphocytes, as well as their intercellular interaction by using flow cytometry immunostaining for CD3, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4, CD8, CD20, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, CD28, CD40. The test was performed by using a Beckman Coulter Epics XL laser flow cytometer. Depending on the condition severity, all children were divided into two groups: 1 — cytomegalovirus infection, severe form — 60 subjects (45.1%); 2 — cytomegalovirus infection, moderate form — 73 subjects (54.9%). Results of the entire set of studied indicators for cellular and humoral arms of immune system revealed statistically significant differences for the prognosis of severe cytomegalovirus infection: CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD20, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, CD4. T lymphocytes with CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> activation markers, through which costimulating signals necessary for the activation of T helper cells are exerted cell-intrinsic features, serving as an important factor ensuring immune response. Using the "classification trees" method, we developed a differentiated approach to forecast severe cytomegalovirus infection in newborns. Systems of inequalities were obtained, four of which classify a subgroup of newborns with severe cytomegalovirus infection. The consistent application of the obtained inequalities makes it possible to isolate from the input stream of sick patients with a prognosis of the development of severe cytomegalovirus infection. The proposed diagnostic rules can be considered as screening markers for predicting a severe cytomegalovirus infection in newborns, which makes possible the timely onset of specific therapy.

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

## Введение

Цитомегаловирус является наиболее распространенной причиной врожденных инфекций. У детей, инфицированных цитомегаловирусом внутриутробно, даже при отсутствии симптомов в неонатальном периоде могут развиваться отдаленные последствия, наиболее часто — тугоухость.

Врожденная цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) проявляется иктеричностью кожи, увеличением печени, селезенки, геморрагическим синдромом, уменьшением числа тромбоцитов и прогрессирующей анемией, что свидетельствует о неспецифическом характере клинической симптоматики. Для новорожденных детей с инфекцией, вызванной вирусом цитомегалии, в ряде случаев характерно также развитие энцефалита, хориоретинита и атрофии дисков зрительных нервов [2, 7].

Одной из основных составляющих патогенеза ЦМВИ является дисрегуляция иммунной системы, нарушение координации процессов ее активации и супрессии [1, 6, 8, 10]. Величина и эффективность иммунного ответа определяется межклеточным взаимодействием. В усилении специфического иммунного ответа ключевую роль играет активация Т-клеток, в результате которой они начинают продуцировать цитокины IL-2, IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ .

Для презентации антигена Т-лимфоцитам необходим костимулирующий сигнал, который проводится через рецептор CD28, находящийся на Т-лимфоцитах. Молекулярный контакт Т-лимфоцитов с другими клетками организма необходим для поддержания и завершения иммунного ответа при ЦМВИ. Костимуляторная молекула CD40 на поверхности В-клеток, связываясь с молекулой CD40L, стимулирует дифференцировку в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины. Таким образом,

реализуется основная функция В-клеток, заключающаяся в образовании антител к разнообразным антигенам [5, 9, 11, 12].

Цель исследования — изучить особенности экспрессии костимуляторных молекул CD28, CD40 при активации Т- и В-лимфоцитов и разработать прогностический алгоритм диагностики тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей.

## Материалы и методы

Проведено поперечное ретроспективное когортное исследование. Объектами клинических исследований стали 133 пациента с цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ), манифестировавшей на первом месяце жизни.

Исследование проведено в соответствии со стандартом МЗ РФ от 29 декабря 1998 г. «Правила проведения качественных клинических испытаний в РФ». Протокол исследования одобрен этическим независимым локальным комитетом ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России. При включении в исследование матери всех новорожденных детей подписывали информированное согласие.

В ходе проводимого исследования было выделено две группы новорожденных в зависимости от степени тяжести цитомегаловирусной инфекции: 1 группа — тяжелая форма ЦМВИ — 60 человек (45,1%); 2 группа — среднетяжелая форма ЦМВИ — 73 человека (54,9%).

Диагноз ЦМВИ устанавливался на основании совокупности данных клинико-анамнестической картины и результатов лабораторных исследований с учетом Российских клинических рекомендаций (протоколов) по неонатологии «Диагностика, лечение и профилактика врожденной цитомегаловирусной инфекции» [4] и «Клинических рекомендаций ока-

зания медицинской помощи детям, больным цитомегаловирусной инфекцией» [3].

Иммунологическое исследование включало изучение Т- и В-лимфоцитов периферической крови с помощью проточной цитофлуориметрии: CD3, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4, CD8, CD20, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, CD28, CD40.

Результаты теста учитывали на лазерном проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Epics XL.

Нами был применен критерий Манна–Уитни для независимых выборок, который служит для выявления статистической значимости путем расчета  $p$  — значения по вышеуказанным исследуемым параметрам. В случае  $p \leq 0,05$  предполагалось, что исследуемые выборки по этим параметрам не случайны, т. е. между ними, возможно, существуют связи и взаимодействия, которые были изучены в данном исследовании.

Так как исследуемые иммунологические параметры не имели нормального распределения, для представления результатов приводятся значения медианы и границы межквартильных интервалов (I–III квартиль).

Для выбора статистически значимых параметров для прогноза тяжелой формы ЦМВИ при помощи пакета SPSS 26.00 были применены метод (алгоритм) «случайный лес», где из входного потока параметров составлялась некая иерархия важности параметров (т. е. подпоток параметров), и метод (алгоритм) «деревья решений», с помощью которого строились (выявлялись) аналитические зависимости.

Метод «деревья решений» — гибкое средство прогнозирования принадлежности объекта к определенному иерархическому классу (в нашем исследовании — тяжелая форма ЦМВИ). Качество классификационной модели, построенной при помощи «дерева решений», характеризуется точностью распознавания объектов, правильно классифицированных. Для построения бинарного дерева решений предназначен алгоритм CART. Алгоритм конструирования «дерева решений» не требует выбора входных атрибутов. На вход алгоритма подавались все исследуемые атрибуты (независимые переменные, т. е. все исследуемые факторы) вне зависимости от их статистической значимости; последовательное исключение по одному привело к тому, что остались только наиболее статистически значимые. И только они были использованы для построения «дерева».

Для оценки диагностической (прогностической) информативности используемого метода применялся ROC-анализ с построением операционной характеристической кривой (Receiver Operator Curve), в ходе которого рассчитывалось

пороговое значение, в котором отличия чувствительности и специфичности минимальны, т. е. имеется максимальная сбалансированность чувствительности и специфичности.

Площадь под ROC-кривой (Area Under Curve, AUC) показывает объективную оценку качества диагностического метода. Информативность теста считалась отличной при значении AUC 0,9–1,0.

## Результаты

В связи с тем, что в данном исследовании имело место ненормальное распределение данных, нами был использован критерий Манна–Уитни для независимых выборок при определении статистической значимости различий между группами.

Полученные результаты представлены в табл. 1 и на рис. 1, 2 в виде медианы и интерквартильного размаха (I–III квартиль). Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что различия между группами по большинству исследуемых параметров (CD4, CD20, CD28, CD40, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) по критерию Манна–Уитни для независимых выборок не случайны и статистически значимы. Рисунки 1 и 2 графически подтверждают это.

Дифференцированный подход к прогнозу тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных детей был разработан с помощью метода «деревья решений». Показатели, необходимые для определения чувствительности и специфичности, представлены в табл. 2.

В результате применения метода «деревья решений» было выделено множество значимых входных переменных для прогноза тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции: CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD20, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, CD4.

С помощью данного метода (рис. 3) также были получены системы неравенств, четыре из которых классифицируют I группу. Последовательное применение полученных неравенств позволяет выделить из входного потока больных пациентов с прогнозом развития тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции.

Применение метода «деревья решений» позволило сформулировать следующее диагностическое правило: если выполняются последовательно неравенства

$$\begin{aligned} & CD3^+CD28^- > 14,085; \\ & CD3^+CD28^- \leq 14,085 \text{ и } CD20 > 37,2; \\ & CD3^+CD28^- \leq 14,085 \text{ и } CD20 \leq 37,2 \\ & \text{и } CD20^+CD40^+ > 17,915 \text{ и } CD4 \leq 29,41; \\ & CD3^+CD28^- \leq 14,085 \text{ и } CD20^+CD40^+ > 17,915 \\ & \text{и } CD4 > 29,41 \text{ и } 18,3 < CD20 \leq 19,995, \end{aligned}$$

то прогнозируем тяжелую форму цитомегаловирусной инфекции.

**Таблица 1. Характеристика Т- и В-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией при различных формах заболевания**

Table 1. Characterization of T and B lymphocytes in newborns with cytomegalovirus infection in various forms of the disease

Иммунологический показатель Immunological index	Группа 1 Group 1 n = 60	Группа 2 Group 2 n = 73	Значимость различий между группами Relevance differences between groups
CD3	68,60 (60,87–78,88)	66,00 (56,70–77,00)	0,416
CD4	41,25 (33,60–51,31)	47,00(41,13–55,83)	0,003
CD8	17,02 (13,20–20,97)	17,20(14,50–24,46)	0,414
CD20	20,14 (11,78–29,90)	16,02 (9,20–29,90)	0,001
CD28, %	9,18 (1,95–15,76)	3,38 (1,71–5,69)	0,0001
CD40, %	5,03 (1,00–11,51)	3,12 (0,80–5,68)	0,0001
CD3 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> , %	50,10 (41,26–60,25)	61,35 (53,85–72,31)	0,0001
CD3 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> , %	7,18 (2,46–15,43)	10,51(4,41–17,30)	0,495
CD3 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> , %	18,52 (6,90–37,26)	4,49 (2,80–7,30)	0,0001
CD20 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> , %	24,23 (16,70–30,22)	15,82 (10,17–22,30)	0,0001

**Примечание.** Результаты представлены в виде медианы, в скобках даны значения 1–3 квартилей.  
Note. The results are presented as a median, showing relevant 1–3 quartile values in brackets.

Кроме того, этот метод позволяет сформировать таблицу сопряженности (табл. 2), с помощью которой были рассчитаны параметры информационной значимости диагностического теста по прогнозу развития тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции, представленные в табл. 4. Высокая чувствительность (100%), специфичность (90,1%) и диагностическая точность метода (94%) отражают силу связи влияния уровня содержания у новорожденных в сыворотке крови Т-лимфоцитов без рецепторов CD28,

Т-хелперов, В-лимфоцитов и В-лимфоцитов с рецепторами CD40 на развитие тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции.

В результате анализа диагностической ценности вышеуказанного метода прогноза тяжелой формы ЦМВИ с помощью ROC-анализа было показано, что информативность используемых иммунологических параметров характеризуется как «отличная», о чем свидетельствует площадь под кривой (AUC – 0,974).

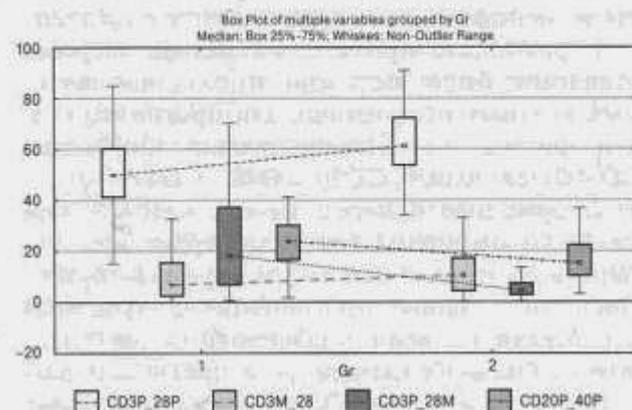
## Обсуждение

Проведенный статистический анализ методом «дерева решений» позволяет судить о степени влияния на вероятность развития тяжелой формы ЦМВИ полученных статистически значимых факторов риска.

Как видно из табл. 3, из 10 исходных параметров получены статистически значимые данные о влиянии величины В-лимфоцитов, В-лимфоцитов с рецепторами костимуляции CD40, Т-хелперов и Т-лимфоцитов без рецепторов костимуляции CD28 на прогноз тяжелой формы ЦМВИ (табл. 3). Проведенный статистический анализ не установил статистически достоверных значений для CD3, CD8, CD28, CD40, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, что исключает их влияние на риск развития тяжелой формы инфекции, вызванной вирусом цитомегалии, у новорожденных детей.

В 1-й группе пациентов выявлен иммунологический дисбаланс, свидетельствующий об истощении адаптивных механизмов: он способствует длительной персистенции вируса и развитию тяжелой формы ЦМВИ.

Данную статистическую зависимость объясняют известные факты. Ключевую роль в функ-

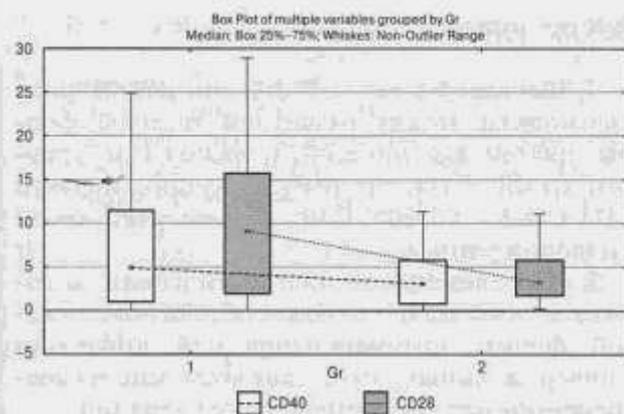


**Рисунок 1. График переменных (CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>), сгруппированных в зависимости от формы ЦМВИ**

Figure 1. Graph of variables (CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>), grouped according to the form of CMVI

**Примечание.** CD3P\_28P – CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>; CD3M\_28 – CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>; CD3P\_28M – CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>; CD20P\_40P – CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>.

Note. CD3P\_28P – CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>; CD3M\_28 – CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>; CD3P\_28M – CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>; CD20P\_40P – CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>.



**Рисунок 2. График переменных (CD40, CD28), сгруппированных в зависимости от формы ЦМВИ**

Figure 2. Graph of variables (CD40, CD28), grouped according to the form of CMVI

ционировании иммунной системы играют межклеточные взаимодействия. Так, для активации Т-лимфоцитов при распознавании антигена необходим дополнительный стимулирующий фактор (костимуляционный сигнал), который реализуется через дополнительную молекулу, экспрессированную на мембране Т-клеток CD28 [5, 9, 12]. Увеличение Т-лимфоцитов без маркеров активации CD28 (CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) свидетельствует о дисрегуляции рецептор-опосредованной активации Т-лимфоцитов за счет блокировки CD28-костимуляторного сигнала при тяжелой форме ЦМВИ.

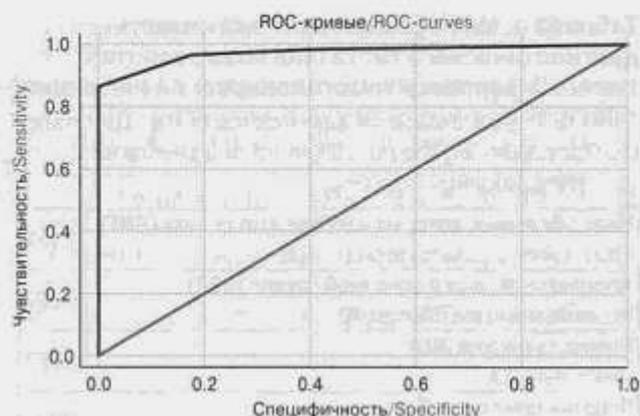
Повышенное содержание Т-лимфоцитов без маркеров активации CD28 CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (табл. 1) у больных ЦМВИ, протекающей в тяжелой форме, приводит к нарушению внутриклеточной сигнальной трансдукции и последующей активации Т-лимфоцитов, что вызывает Т-клеточную анергию и индуцирует антиген-специфическую толерантность.

Молекулярный контакт Т-лимфоцитов с другими клетками организма необходим для начала поддержания и завершения иммунного ответа на внедрение цитомегаловируса у детей первого месяца жизни.

Величину и эффективность иммунного ответа определяют костимуляторные молекулы, основные из которых принадлежат семейству B7. В отсутствие костимуляции (дефицит CD28-молекул) Т-клетка становится функционально неспособной к ответу, что приводит к развитию иммунологической толерантности у новорожденных с тяжелой формой ЦМВИ.

Прочность межклеточного Т-В-контакта обеспечивается молекулами костимуляции CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>.

Сопоставление данных корреляции CD20<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> у пациентов с различной формой



**Рисунок 3. Прогноз вероятности для тяжелой формы ЦМВИ (группа 1)**

Figure 3. Probability forecast for severe CMVI (group 1)

ЦМВИ демонстрирует, что продукция мембранного костимулирующего рецептора CD40<sup>+</sup> у новорожденных статистически значимо выше при тяжелой, чем при средне-тяжелой форме ЦМВИ.

Таким образом, суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что риск развития тяжелой формы ЦМВИ возникает, прежде всего, из-за нарушения экспрессии костимуляторных рецепторов на начальном этапе формирования адаптивного иммунного ответа.

**Таблица 2. Таблица сопряженности**

Table 2. Contingency table

Группы Groups	Классификация Classification		
	Предсказанные группы Predicted groups		
	1	2	Процент правильных предсказаний Percentage of correct predictions
1	52	8	86,7%
2	0	73	100,0%
<b>Общая процентная доля Total percentage</b>	39,1%	60,9%	94,0%

**Таблица 3. Важность независимых переменных**

Table 3. The importance of independent variables

Независимая переменная Independent variable	Нормализованная важность Normalized importance
CD3 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	100,0%
CD20	46,6%
CD20 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup>	12,0%
CD4	9,3%

**Таблица 4. Информационная значимость диагностического теста прогноза развития тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции**

Table 4. The informational significance of the diagnostic test for predicting the development of a severe form of cytomegalovirus infection

Число больных, которых необходимо лечить (NNT) The number of patients to be treated	1,154
Абсолютный риск в основной группе (EER) Absolute risk in the main group	0,867
Разность рисков (RD) Risk difference	0,867
Чувствительность (Se) Sensitivity (Se)	100%
Специфичность (Sp) Specificity (Sp)	90,1%
Диагностическая точность теста (Ac) Diagnostic accuracy test (Ac)	94%
Шанс обнаружения фактора риска в основной группе Chance of finding a risk factor in the main group	6,500
Шанс обнаружения фактора риска в контрольной группе Chance of detecting a risk factor in the control group	0,000

## Заключение

1. Выявлена в высшей степени достоверная взаимосвязь между развитием тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции и уровнем CD20, CD4, костимулирующих молекул CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD20<sup>+</sup>CD40<sup>-</sup> в сыворотке крови у новорожденных.

2. Предложенный диагностический алгоритм можно использовать для прогноза тяжелой формы цитомегаловирусной инфекции у новорожденных, что делает возможным своевременное начало специфической терапии.

## Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы/References

1. Ватазин А.В., Зул'карнаев А.Б., Федулкина В.А., Крстич М. Основные межклеточные взаимодействия при активации Т-клеток в отторжении почечного трансплантата // Альманах клинической медицины. 2014. № 31. С. 76–82. [Vatazin A.V., Zul'karnaev A.B., Fedulkina V.A., Krstic M. Major intercellular interactions at the T cell activation in renal transplant rejection. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2014, no. 31, pp. 76–82. (In Russ.)]
2. Карпова А.Л., Нароган М.В., Карпов Н.Ю. Врожденная цитомегаловирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2017. Т. 62, № 1. С. 10–18. [Karpova A.L., Narogan M.V., Karpov N.Yu. Congenital cytomegalovirus infection: diagnosis, treatment, and prevention. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Herald of Perinatology and Pediatrics*, 2017, vol. 62, no. 1, pp. 10–18. (In Russ.)] doi: 10.21508/1027-4065-2017-62-1-10-18
3. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным цитомегаловирусной инфекцией / Под ред. Ю.В. Лобзина, СПб.: ФГБУ НИИДИ ФМБА России, ЕАОИБ, АВИСПО, 2015. 31 с. [Clinical recommendations (treatment protocol) for the provision of medical care for children with cytomegalovirus infection / Ed. by Yu.V. Lobzin. *St. Petersburg: Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency of Russia, Euro-Asian Society for Infectious Diseases, St. Petersburg and Leningrad Region Infectious Diseases Physicians Association*, 2015. 31 p. (In Russ.)]
4. Клинические рекомендации (протоколы) по неонатологии / Под ред. Д.О. Иванова, СПб.: Информ-Навигатор, 2016. 464 с. [Clinical recommendations (protocols) on neonatology / Ed. by D.O. Ivanov. *St. Petersburg: Inform-Navigator*, 2016. 464 p. (In Russ.)]
5. Кравченко Л.В. Роль нарушений активации Т-лимфоцитов у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 288–294. [Kravchenko L.V. A role of impaired neonatal T cell activation upon late CMV detection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 288–294. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-288-294
6. Кравченко Л.В., Левкович М.А. Механизмы иммуносупрессии при частых острых респираторно-вирусных инфекциях у детей, перенесших цитомегаловирусную инфекцию в периоде новорожденности // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 3, № 9. С. 34–38. [Kravchenko L.V., Levkovich M.A. Mechanisms of immunosuppression upon frequent acute viral respiratory infections in infants after neonatal cytomegalovirus infection. *VICH-infekcia i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 34–38. (In Russ.)] doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-3-34-38
7. Кравченко Л.В., Левкович М.А., Пятикова М.В. Роль полиморфизма гена интерферон  $\gamma$  и интерферонпродукции в патогенезе инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа у детей раннего возраста // Клиническая лабораторная диагностика. 2018. Т. 63, № 6. С. 357–361. [Kravchenko L.V., Levkovich M.A., Pyatikova M.V. The role of polymorphism of the interferon gene  $\gamma$  and interferonoproduction in the pathogenesis of infection caused by herpes 6 type virus in children of early age. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2018, vol. 63, no. 6, pp. 357–361. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-6-357-361
8. Сенников С.В., Куликова Е.В., Кнауэр Н.Ю., Хантакова Ю.Н. Молекулярно-клеточные механизмы, опосредуемые дендритными клетками, участвующие в индукции толерантности // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 4. С. 359–374. [Sennikov S.V., Kulikova E.V., Knauer N.Y., Khantakova Y.N. Molecular and cellular mechanisms mediated by

- dendritic cells involved in the induction of tolerance. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, vol. 19, no. 4, pp. 359–374. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-359-374
9. Сизякина Л.П., Харитоновна М.В. Характеристика В2-лимфоцитов у пациентов с серопозитивным ревматоидным артритом суставной формы // Иммунология. 2017. Т. 38, № 4. С. 226–228. [Sizyakina L.P., Kharitonova M.V. Characteristics of B2 lymphocytes in patients with seropositive rheumatoid arthritis articular form. *Immunologiya = Immunologiya*, 2017, vol. 38, no. 4, pp. 226–228. (In Russ.)] doi: 10.18821/0206-4952-2017-38-4-226-228
  10. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p. (In Russ.)]
  11. Berthelot J.M., Jamin C., Amrouche K. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, 2013, vol. 80, no. 1, pp. 18–22. doi: 10.1016/j.jbspin.2012.04.010
  12. Candando K.M., Lykken J.M., Tedder T.F. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol. Rev.*, 2014, vol. 259, no. 1, pp. 259–272. doi: 10.1111/immr.12176

**Автор:**

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

**Author:**

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

Поступила в редакцию 10.07.2020

Принята к печати 27.03.2021

Received 10.07.2020

Accepted 27.03.2021

# АССОЦИАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ДИАРЕЙ С ЛЕТАЛЬНЫМИ ИСХОДАМИ У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

А.Т. Подколзин, Т.А. Кожухметова, Д.Х. Кясова, З.Х. Далелова, К.В. Кулешов,  
А.Н. Гусева, А.С. Павлова, О.А. Веселова, Н.В. Паркина, Т.А. Коновалова,  
С.Б. Яцышина

ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Резюме.** Инфекционные диареи являются одной из ведущих причин развития летального исхода у детей младшего возраста. Их дифференциальная диагностика представляет объективные трудности в первые часы заболеваний. Данные лабораторных исследований аутопсийного материала и патологоанатомических исследований дают ценную информацию для представления о спектре дифференциальной диагностики и этиологической структуры инфекционных диарей у детей младшего возраста с летальными исходами. *Материалы и методы.* В исследование были включены 100 зарегистрированных на территории РФ в период с ноября 2011 по декабрь 2019 г. случаев летального исхода у детей в возрасте младше шести лет, которым на различных этапах оказания медицинской помощи был поставлен диагноз инфекционной диареи. Проводился анализ данных, представленных в медицинской документации, и исследование образцов аутопсийного материала с применением методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК). *Результаты.* По результатам комплекса прижизненных и посмертных исследований диагноз «инфекционная диарея» был пересмотрен у 24 пациентов. У пациентов с неподтвержденным диагнозом «острая кишечная инфекция» (ОКИ) наиболее часто выявлялись пневмонии — 45,8% (11/24), сепсис — 29,2% (7/24), менингиты/менингоэнцефалиты, острая хирургическая патология и асфиксия, связанная с аспирацией рвотных масс, — по 16,7% (4/24). Возбудители инфекционных диарей были выявлены у 71 из 76 пациентов с подтвержденным диагнозом ОКИ. Наибольшее распространение имели ротавирусы группы А — 52,6% (40/76), аденовирусы группы F — 17,1% (13/76) и норовирусы — 13,2% (10/76). В 29 случаях (38,2%) выявлялись сочетания патогенов. У пациентов с инфекционными диареями летальный исход на догоспитальном этапе наблюдался в 17 (22,4%) случаях. Дети первого года жизни составили 62,2%, второго — 20,3% от общего количества пациентов с летальными исходами на фоне ОКИ. У 64 из 76 (84,2%) детей отсутствовал неблагоприятный преморбидный фон. Патологиями, наиболее часто сочетающимися с инфекционными диареями при развитии летального исхода, были пневмонии (в том числе аспирационные) — 22,4% (17/76) и аспирационная асфиксия — 6,6% (5/76). У 7,9% (6/76) детей был диагностирован гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с диареей. *Выводы.* Дети первых лет жизни являются группой риска развития летального исхода при инфекционных диареях. Отсутствие неблагоприятного преморбидного фона не должно рассматриваться в качестве достоверного позитивного прогностического критерия. Диагностика пневмоний должна входить в обязательный план обследования детей с тяжелым течением инфекционных диарей. По ре-

## Адрес для переписки:

Подколзин Александр Тихонович  
111123, Россия, Москва, Новогиреевская ул., 3А,  
ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (495) 974-96-46.  
E-mail: apodkolzin@pcr.ru

## Contacts:

Aleksander T. Podkolzin  
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireevskaya str., 3A,  
Central Research Institute of Epidemiology.  
Phone: +7 (495) 974-96-46.  
E-mail: apodkolzin@pcr.ru

## Для цитирования:

Подколзин А.Т., Кожухметова Т.А., Кясова Д.Х., Далелова З.Х.,  
Кулешов К.В., Гусева А.Н., Павлова А.С., Веселова О.А., Паркина Н.В.,  
Коновалова Т.А., Яцышина С.Б. Ассоциация возбудителей  
инфекционных диарей с летальными исходами у детей дошкольного  
возраста // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 752–762.  
doi: 10.15789/2220-7619-ARB-1515

## Citation:

Podkolzin A.T., Kozhakhmetova T.A., Kyasova D.Kh., Dalelova Z.Kh.,  
Kuleshov K.V., Guseva A.N., Pavlova A.S., Veselova O.A., Parkina N.V.,  
Konovalova T.A., Yatsyshina S.B. A relationship between causative agents  
of infectious diarrhea and fatal outcomes in pre-school children // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4,  
pp. 752–762. doi: 10.15789/2220-7619-ARB-1515

зультатам исследования клинического и аутопсийного материала ротавирусы группы А лидируют среди возбудителей инфекционных диарей с летальными исходами у детей младшего возраста. Особое внимание в первые дни болезни должно уделяться профилактике аспирации рвотных масс.

**Ключевые слова:** инфекционная диарея, дети, дифференциальная диагностика, летальный исход, ПЦР.

## A RELATIONSHIP BETWEEN CAUSATIVE AGENTS OF INFECTIOUS DIARRHEA AND FATAL OUTCOMES IN PRE-SCHOOL CHILDREN

Podkolzin A.T., Kozhakhmetova T.A., Kyasova D.Kh., Dalelova Z.Kh., Kuleshov K.V., Guseva A.N., Pavlova A.S., Veselova O.A., Parkina N.V., Konovalova T.A., Yatsyshina S.B.

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Infectious diarrhea is one of the leading causes of fatal outcomes in young children. Differential diagnostics of such infections within the first hours of illness poses significant objective obstacles. Data from laboratory studies of autopsy material and pathological studies provide valuable information for understanding the spectrum of differential diagnostics and etiological structure of infectious diarrhea with fatal outcomes in young children. *Materials and methods.* There were analyzed 100 cases of fatal outcomes in children under the age of six years registered in Russia from November 2011 to December 2019, who was diagnosed with infectious diarrhea at different levels of the healthcare system. The data were assessed based on available medical case reports and the laboratory testing of autopsy samples performed by using nucleic acid amplification methods. *Results.* The diagnosis of infectious diarrhea was revised in 24 patients, based on the data of a set of intravital and post-mortem studies. In patients with unconfirmed diagnosis of acute intestinal infections, pneumonia was the most often detected — in 45.8% (11/24), sepsis — in 29.2% (7/24), meningitis/meningoencephalitis, acute surgical pathology and asphyxiation associated with vomit aspiration — in 16.7% (4/24) cases. The causative agents of infectious diarrhea were identified in 71 of 76 patients with confirmed diagnosis of acute intestinal infections. Most prevalent were group A rotaviruses — 52.6% (40/76), group F adenoviruses — 17.1% (13/76), and noroviruses — 13.2% (10/76). Combination of pathogens was detected in 29 cases (38.2%). Prehospital lethal outcomes in patients with infectious diarrhea were observed in 17 cases (22.4%). In total, rate of neonatal deaths due to acute intestinal infections accounted for 62.2% and 2-year-old toddlers — 20.3%. 64 of 76 (84%) children had no unfavorable premorbid background. The most common pathologies associated with infectious diarrhea with developing fatal outcomes were pneumonia (including aspiration pneumonia) in 22.4% (17/76) and aspiration asphyxia in 6.6% (5/76). Hemolytic-uremic syndrome associated with diarrhea was diagnosed in 7.9% (6/76) of children. *Conclusions.* Within the first years of life children comprise a risk group for developing fatal outcomes during infectious diarrhea. Lack of unfavorable premorbid background should not be considered as a reliable positive prognostic criterion. Diagnostics of pneumonia should be included in the mandatory examination plan for children with severe infectious diarrhea. Based on study of clinical and autopsy material, group A rotaviruses were the lead causative agents among those resulting in infectious diarrhea with fatal outcomes in young children. Special attention should be paid to preventing vomit aspiration within the first days after disease onset.

**Key words:** infectious diarrhea, children, differential diagnosis, fatal outcome, PCR.

## Введение

Инфекционные диареи занимают одно из ведущих мест в структуре инфекционных заболеваний, приводящих к летальному исходу у детей младшего возраста [5, 13]. Дифференциальная диагностика тяжелых форм инфекционных диарей в дебюте заболевания может осложняться неспецифичностью симптоматики и переоценкой значимости синдрома диареи. Включение острых кишечных инфекций в формулировки диагноза на первичных этапах оказания медицинской помощи является распространенной практикой, отражающей настороженность медицинских работников в отношении данной патологии. Однако значительная часть направительных диагнозов, диагнозов приемных отделений и предварительных клинических диагнозов пересматривается при последующем

обследовании пациентов. Наряду с решением задач дифференциальной диагностики для клинической практики важна объективная оценка спектра потенциальных возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ), ассоциированных с тяжелым течением инфекционных диарей и развитием летального исхода у детей младшего возраста [11]. Для решения задач посмертной этиологической диагностики наиболее информативными по причине достижимой стандартизации при исследовании аутопсийного материала являются методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК).

Целью данной работы была оценка распространенности различной патологии при развитии летального исхода у детей первых лет жизни на фоне диагностированных на различных этапах оказания медицинской помощи инфекционных диарей.

## Материалы и методы

В исследование были включены случаи заболевания с летальным исходом у детей в возрасте младше шести лет, с постановкой диагноза ОКИ на любом этапе оказания медицинской помощи, зарегистрированные на территории РФ в период с ноября 2011 по декабрь 2019 г. Из исследования были исключены несколько случаев летального исхода, зарегистрированных в очаге вспышки шигеллеза Зонне и описанных ранее [1]. Анализировались данные, представленные в посмертных эпикризах, протоколах патологоанатомического исследования, клинических историях болезни.

При анализе параметров развития летального исхода у пациентов с инфекционными диареями из общего числа случаев были исключены те, при которых любые синдромы поражения ЖКТ не входили в формулировки заключительного клинического диагноза или патологоанатомического заключения. Отрицательные результаты лабораторных исследований аутопсийного материала на наличие возбудителей инфекционных диарей не рассматривались в качестве критерия для исключения диагноза инфекционной диареи.

Проводилось лабораторное исследование аутопатов фрагментов тонкой и толстой кишки, содержимого кишечника, легких, головного мозга, селезенки, печени, реже — других

органов. В связи с возможной перекрестной контаминацией различных локусов при проведении патологоанатомического исследования учитывалось соотношение значений пороговых циклов для различных диагностических мишеней в стерильных и нестерильных локусах организма. Лабораторное исследование проводилось с применением наборов реагентов «Амплиценс» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Для базового скрининга использовались наборы реагентов «Амплиценс® ОКИ скрин-FL» № ФСП 2008/02265 (Rotavirus grA, Norovirus GI, Astrovirus, Adenovirus grF, *Shigella* spp./EPEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* [термофильная группа]), «Амплиценс® Norovirus GI/GII-FL» № РЗН 2018/7703 (Norovirus GI, Norovirus GII), «Амплиценс® Эшерихиозы-FL» № ФСП 2010/07977 (EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, EAgEC), «Амплиценс® *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*-FL» № ФСП 2010/07830 (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* [с дифференцировкой вирулентных изолятов]). При расширенном исследовании использовались наборы реагентов для диагностики гнойных менингитов, а также группы респираторных и оппортунистических инфекций. Для выявления ряда патогенов (*C. perfringens*, *V. parahaemolyticus*, *E. sakazakii*) использовались лабораторные методики с подтверждением специфичности полученных результатов методом секвенирования по Сенгеру.



**Рисунок 1. Территории, направлявшие материалы на исследование в период 2011–2019 гг.**

Figure 1. Territories that provided biological material for research in the years 2011–2019

**Примечание.** Диаметр маркеров соответствует количеству направленных на исследование случаев (100 случаев, от 1 до 25 с каждой территории).

Note. The diameter of the markers corresponds to the number of cases sent out for investigation (100 cases, from 1 to 25 per territory).

Для оценки достоверности различий между изучаемыми показателями использовались тесты Манна–Уитни (Mann–Whitney) и хи-квадрат Пирсона (Pearson Chi-Square), распределение переменных характеризовалось средним, минимальным и максимальным значением и среднеквадратичным отклонением ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ). Для оценки распространенности генотипов патогенов в популяции на территории РФ использовались данные референс-центра по мониторингу ОКИ (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Генотипирование сальмонелл проводилось с применением метода анализа набора продуктов рестрикции тотальной ДНК в пульсирующем электрическом поле — пульс-электрофорез (PFGE — Pulsed Field Gel Electrophoresis) с использованием протоколов PulseNet International Network. Обработка полученных данных проводилась с применением программного комплекса BioNumerics 6.6 (Applied Maths, США).

## Результаты

В исследование были включены случаи заболевания с летальным исходом, зарегистрированные на территории 26 субъектов РФ (рис. 1).

Не во всех случаях для исследования представлялся полный перечень запрашиваемых образцов аутопсийного материала. Наиболее часто на исследование направлялись аутопаты тонкой и толстой кишки (87–88%), содержимого кишечника (26%), легких (91,7%), головного мозга (61%), селезенки (56%), реже — других эпителиев.

В 24 случаях в заключительном клиническом и/или патологоанатомическом диагнозе наличие острых кишечных инфекций не было подтверждено. Патология, ассоциированная с летальным исходом у данных пациентов, представлена в табл. 1.

В данной группе пациентов значительную долю составляли дети с пневмониями, которые выявлялись у 11 (42%) из них, причем у 6 (25%) в качестве единственного заболевания. Также с высокой частотой диагностировался сепсис: у 8 детей (35%) и у 4 (17%) в качестве единственного заболевания). Следует также обратить внимание на наличие у 3 (12%) детей в медицинской документации записей о наличии тимико-лимфатического статуса в качестве преморбидного фона.

Летальный исход на фоне ОКИ были зарегистрированы у 46 (62,2%) детей в возрасте младше года, 15 (20,3%) детей второго года жизни, у 6 (8,1%) детей в возрастных группах 2–3 и 3–4 лет, двух (2,7%) детей в возрасте 4–5 лет и одного (1,4%) в возрастной группе 5–6 лет. Соотношение возраста заболевших, этиологии заболевания и сроков наступления летальных исходов отражено на рис. 2 (вклейка, с. 1).

**Таблица 1. Патология, диагностированная у пациентов (n = 24) с неподтвержденным диагнозом ОКИ**

Table 1. Pathology diagnosed in patients (n = 24) with unconfirmed diagnosis of acute intestinal infections

Патология Pathology	Кол-во случаев (%) Number of cases (%)
Пневмония/Pneumonia	6 (25,0%)
Острая хирургическая патология* Acute surgical pathology*	4 (16,7%)
Сепсис**/Sepsis**	4 (16,7%)
Сепсис + пневмония Sepsis + pneumonia	4 (16,7%)
Менингиты/Meningitis	2 (8,3%)
Синдром внезапной смерти Sudden death syndrome	1 (4,2%)
Пневмония + менингоэнцефалит Pneumonia + meningoencephalitis	1 (4,2%)
Энтеровирусная инфекция Enterovirus infection	1 (4,2%)
Острое респираторное заболевание, гипертермический синдром, отек головного мозга Acute respiratory disease, hyperthermia syndrome, cerebral edema	1 (4,2%)

Примечания. \* — случаи острой хирургической патологии включали два случая с инвагинацией, один случай с ущемленной грыжей и один случай с перитонитом на фоне онкологического заболевания; \*\* — случаи сепсиса включали один случай с *N. meningitidis* (менингококцемия) и один случай с *S. maltophilia*.

Notes. \* — cases of acute surgical pathology included two cases with invagination, one case with a strangulated hernia, and one case with peritonitis associated with cancer; \*\* — cases of sepsis included one case with *N. meningitidis* (meningococemia) and one case with *S. maltophilia*.

**Таблица 2. Прогностически значимая острая патология у пациентов (n = 33) с летальным исходом при инфекционных диареях**

Table 2. Prognostically significant acute pathology in patients (n = 33) with lethal outcomes with infectious diarrhea

Патология Pathology	Кол-во случаев (%) Number of cases (%)
Пневмония/Pneumonia	16 (21,1%)
Гемолитико-уремический синдром Hemolytic uremic syndrome	6 (7,9%)
Аспирационная асфиксия Aspiration asphyxia	4 (5,3%)
Острая хирургическая патология Acute surgical pathology	2 (2,6%)
Энцефалит/Encephalitis	1 (1,3%)
Геморрагический инсульт Hemorrhagic stroke	1 (1,3%)
Гемолитико-уремический синдром + энцефалит Hemolytic uremic syndrome + encephalitis	1 (1,3%)
Пневмония + аспирационная асфиксия Pneumonia + aspiration asphyxia	1 (1,3%)
Сепсис/Sepsis	1 (1,3%)

**Таблица 3. Распределение различных патогенов в случаях их сочетанного и изолированного выявления в аутопсийном материале**

Table 3. Distribution of detected various pathogens in autopsy material in combined and isolated cases

Патогены Pathogens	Случаи выявления единственного патогена (n) Cases of detected single pathogen (n)	Случаи выявления сочетаний патогенов (n) Cases of detected combinations of pathogens (n)
Ротавирусы группы А/Rotavirus grA	24*	16
Энтерогеморрагическая <i>E. coli</i> (EHEC)/Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)	3	3
Аденовирусы группы F/Adenovirus grF	3	10
<i>C. sakazakii</i>	2	1
Энтеропатогенная <i>E. coli</i> (EPEC)/Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	2**	5
<i>Salmonella enterica</i> sbsp. <i>enterica</i>	1	4
Астровирусы/Astrovirus	1	3
Группа термофильных <i>Campylobacter</i> spp./Thermophilic group of <i>Campylobacter</i> microorganisms	1	5
Норовирусы/Norovirus	1	9
Энтероагрегативные <i>E. coli</i> (EAgEC)/Enterocaggregative <i>E. coli</i> (EAgEC)	1***	5
<i>Shigella</i> spp. (EIEC)	1	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	0
<i>C. perfringens</i>	1	0
Энтеротоксигенные <i>E. coli</i> (ETEC)/Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	0	1
<i>Y. enterocolitica</i>	0	1
Отсутствие выявления патогенов/Pathogenes not detected	5	—
Сочетание патогенов/Combinations of pathogens	29	—

**Примечание.** \* — в четырех случаях выявлен только прижизненно, \*\* — возраст пациентов 1,5 и 3,7 мес, \*\*\* — возраст пациента 11,2 мес.  
Note. \* — in four cases pathogens were detected only intravitally, \*\* — age of the patients was 1.5 and 3.7 months, \*\*\* — patient age was 11.2 months.

У 13 пациентов (17%) имели место заболевания, которые могли формировать неблагоприятный преморбидный фон. К их числу относились болезнь Дауна — у двух детей, болезнь Гиршпрунга — у двух детей, а также единичные случаи врожденной ВИЧ-инфекции, сахарного диабета, токсикодистрофического синдрома, декомпенсированного врожденного порока сердца, персистирующей герпесвирусной инфекции с поражением ЦНС, внутрижелудочковых кровоизлияний с квадрипарезом и лейкоэнцефалопатией, врожденного сифилиса.

Помимо перечисленных выше фоновых заболеваний инфекционные диареи сочетались с острой патологией, в ряде случаев определявшей прогноз заболевания (табл. 2).

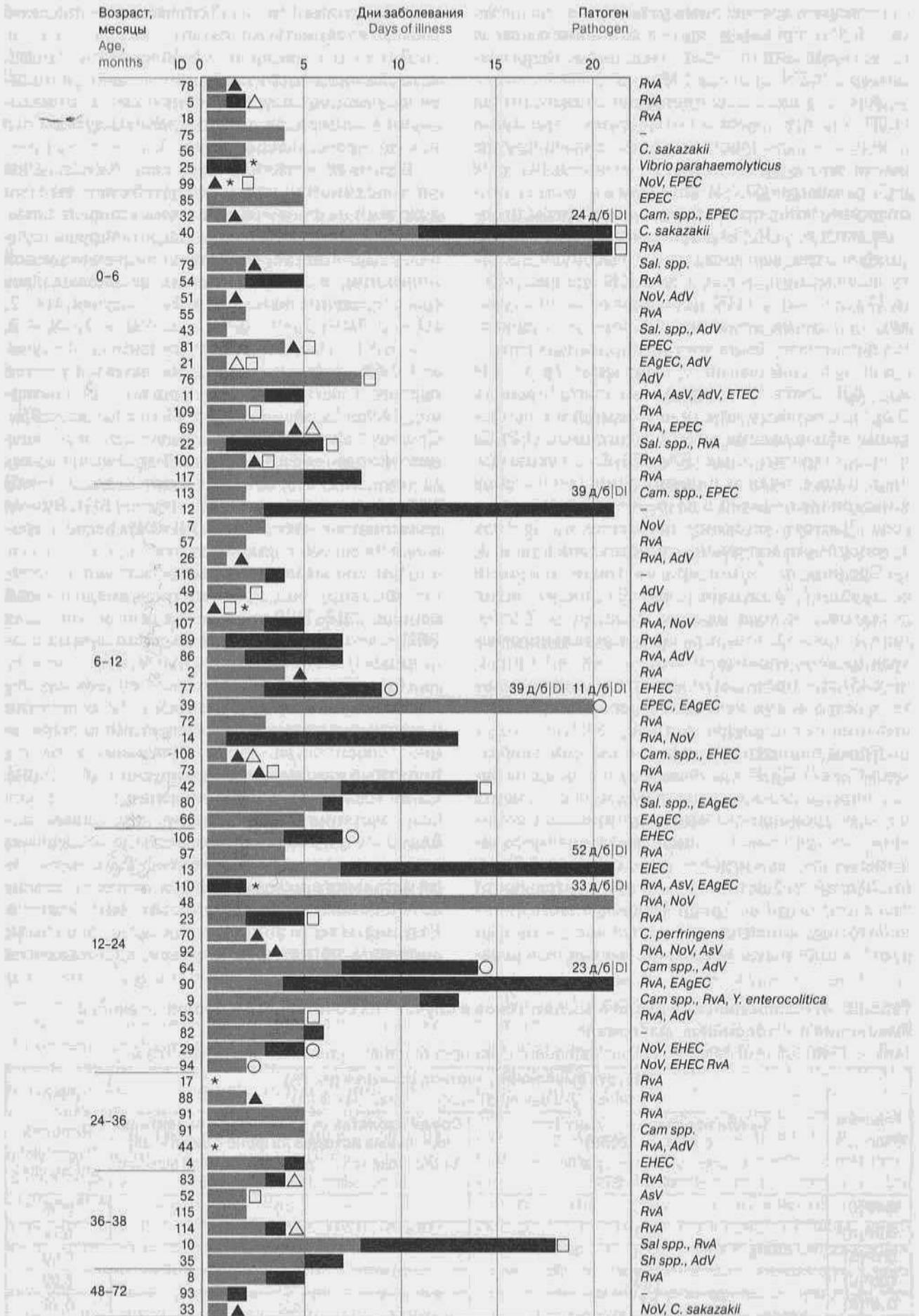
У 5 из 76 (6,6%) пациентов с подтвержденным диагнозом ОКИ ни прижизненно, ни посмертно возбудители инфекционных диарей не детектировались. В 29 (38,2%) случаях применяемый спектр тестирования привел к выявлению более одного и в 5 (6,6%) — более двух патогенов. Между группами пациентов с сочетанным и изолированным выявлением патогенов от-

**Рисунок 3. Динамика госпитализаций и сроки развития летального исхода при различной этиологии инфекционных диарей**

Figure 3. The dynamics of hospitalizations and the timing of deaths for various etiologies of infectious diarrhea

**Примечания.** RvA — ротавирусы группы А, NoV — норовирусы, AdV — аденовирусы группы F, AsV — канонические астровирусы человека, *Cam. spp.* — термофильная группа микроорганизмов рода *Campylobacter*, *Sal. spp.* — микроорганизмы рода *Salmonella*, *Sh. spp.* — микроорганизмы рода *Shigella*. ■ — догоспитальный период, ■ — период стационарного лечения, □ — пневмония, ▲ — летальный исход на догоспитальном этапе, Δ — аспирационный синдром, ○ — гемолитико-уремический синдром. ID — идентификационный номер пациента, д/б — день наступления летального исхода от начала заболевания, \* — данные недоступны.

Notes. RvA — group A rotaviruses, NoV — noroviruses, AdV — group F adenoviruses, AsV — canonical human astroviruses, *Cam. spp.* — thermophilic group of *Campylobacter* microorganisms, *Sal. spp.* — *Salmonella* microorganisms, *Sh. spp.* — *Shigella* microorganisms. ■ — prehospital period, ■ — the period of hospital treatment, □ — pneumonia, ▲ — death at the prehospital stage, Δ — aspiration syndrome, ○ — hemolytic uremic syndrome. ID — patient identification number, DI — day of death from the onset of the disease, \* — data not available.



существовали достоверные различия по возрасту ( $p = 0,511$ ), срокам развития летального исхода на день болезни ( $p = 0,965$ ) и день госпитализации ( $p = 0,229$ , критерий Манна–Уитни).

Как в качестве единственного возбудителя ОЖИ, так и в сочетании с другими патогенами наибольшее распространение в данной группе имели ротавирусы группы А, выявленные у 40 из 76 пациентов (52,6%). При этом в качестве единственного возбудителя заболевания они были обнаружены у 24 (31,6%) детей с летальным исходом.

Несмотря на достаточно высокую частоту выявления в аутоптатах ДНК аденовирусов (в 13 случаях) и РНК норовирусов (в 10 случаях), частота их детекции в сочетании с другими патогенами была достоверно выше частоты случаев изолированного выявления ( $p = 0,04$  и  $p = 0,01$  соответственно; хи-квадрат Пирсона). В связи с особенностями возрастной интерпретации обнаружения энтеропатогенных (ЕРЕС) и энтероагрегативных (ЕАгЕС) *E. coli* учитывались лишь случаи выявления данных патогенов в материале от детей в возрасте младше одного года. Частота детекции патогенов в образцах аутопсийного материала представлена в табл. 3.

Средние значения сроков госпитализации составили  $4,8 \pm 5,6$  (min 1, max 33) дня, развития летального исхода на день болезни —  $7,3 \pm 9,6$  (min 1, max 52) дня и развития летального исхода на день госпитализации —  $3,8 \pm 8,1$  (min 1, max 45) дня (mean±SD). При этом доля пациентов с летальными исходами в первые сутки пребывания в стационаре составила 54%.

Среди пациентов с инфекционными диареями в 17 из 76 (22,4%) случаев летальный исход регистрировался на догоспитальном этапе (смерть на дому либо при оказании медицинской помощи до поступления в стационар). Медианное значение возраста в данной группе составило 6,9 мес. (от 20 дней до 5 лет 7 месяцев) при длительности заболевания от 1 до 4 дней. Наиболее часто в данной группе пациентов (как и в целом в группе лиц с инфекционными диареями) выявлялись рота-

вирусы группы А (в 8 из 17 случаев, в том числе в 5 в качестве единственного патогена).

Динамика развития заболевания, сроки, длительность госпитализации и наличие наиболее распространенной сопутствующей патологии у пациентов с наступлением летального исхода, представлены на рис. 3.

В рамках детектируемого спектра патогенов в аутопсийном материале от детей с летальными исходами на фоне инфекционных диарей с наибольшей частотой выявлялись ротавирусы группы А. Сезонность, свойственная ротавирусной инфекции, в данных случаях не наблюдалась (распределение по месяцам: I — 3 случая, II — 2, III — 2, IV — 3, V — 3, VI — 0, VII — 2, IX — 2, X — 2, XI — 3, XII — 1). В 15 из данных 24 случаев (62,5%) летальный исход наблюдался у детей первого года жизни. Средний возраст составлял  $14,9 \pm 14,9$  мес. (от 1 до 48 мес.) (mean±SD). Среднее значение сроков наступления летального исхода —  $4,7 \pm 4,5$  дней (от 1 до 21 дня) на день заболевания и  $3,8 \pm 4,3$  дней (от 1 до 20 дней) от момента госпитализации (mean±SD). В пяти из данных случаев летальный исход регистрировался на догоспитальном этапе.

При сопоставлении распределения генотипов ротавирусов ([P]G типов) за аналогичный период (2012–2019 гг.) в популяции и в случаях РВИ с летальными исходами достоверных различий выявлено не было (табл. 4).

Норовирусы в аутопсийном материале детектировались преимущественно в сочетании с другими патогенами, что затрудняло выявление особенностей, характеризующих неблагоприятные исходы при норовирусной инфекции. Единственный случай выявления норовирусов без сочетания с другими возбудителями наблюдался у девочки в возрасте 6 месяцев, без отягощенного преморбидного фона с развитием летального исхода на фоне эксикоза, токсикоза с развитием ОГМ на третий день болезни. Результаты генотипирования норовирусов были доступны по четырем случаям их выявления

**Таблица 4. Распределение различных патогенов в случаях их сочетанного и изолированного выявления в аутопсийном материале**

Table 4. Distribution of detected various pathogens in autopsy material in combined and isolated case

Генотип Genotype	Частота выявления генотипа Rotavirus grA (%) Frequency of detected genotype Rotavirus grA (%)		p (хи-квадрат Пирсона p (Pearson Chi-Square)
	Среди изолятов от пациентов с РВИ (n = 2058) Among isolates from patients with RVI (n = 2058)	Среди изолятов от пациентов с развитием летальных исходов на фоне РВИ (n = 25) Among isolates from patients with lethal outcome associated with RVI (n = 25)	
G4P[8]	41,8	36,0	0,56
G9P[8]	21,3	24,0	0,75
G1P[8]	15,9	12,0	0,60
G2P[4]	11,3	12,0	0,92
G3P[8]	8,1	8,0	0,99

в образцах аутопсийного материала. В трех случаях изоляты относились к генотипу GII.P31(GII.Pe)/GII.4 Sydney\_2012 и в одном к генотипу GII.P16/GII.4 Sydney\_2012. При обследовании пациентов в очагах вспышек норовирусной инфекции в период 2012–2019 гг. частота выявления данных генотипов составила соответственно 4,9% (14 из 288 очагов) и 0,7% (2 из 288 очагов).

Аденовирусы группы F (40 и 41 типы) были выявлены в качестве единственных патогенов у трех детей (возраст 4, 7 и 8 мес.). Во всех трех случаях наряду с тяжелым течением инфекционной диареи была диагностирована пневмония.

У трех пациентов в возрасте 9 мес., 1 года и 3 лет с посмертным выявлением ЕНЕС в качестве единственного патогена имела место симптоматика гемоколитита с развитием гемолитико-уремического синдрома. Летальный исход был зарегистрирован на 5, 7 и 9 дни болезни на фоне развития у двух пациентов ИТШ и ОГМ и у одного — толстокишечной инвагинации. Из трех случаев выявления ЕНЕС в сочетании с другими патогенами в двух также диагностировался ГУС (сочетание ЕНЕС с ротавирусами в одном случае и рота- и норовирусами — в другом у детей в возрасте 1 г. 7 мес. и 1 г. 9 мес.), что позволяло предполагать ведущую роль данного патогена в неблагоприятном исходе заболевания, который развился на 2 и 5 день болезни. Наряду с этим были зарегистрированы три случая развития ГУС, ассоциированного с диареей, но не сопровождавшегося детекцией ДНК ЕНЕС в образцах аутопсийного материала. Эти случаи характеризовались поздними сроками наступления летального исхода (14, 39 и 52 день от начала заболевания).

У двух детей в возрасте 1 и 2 месяцев единственным детектированным патогеном, ассоциированным с поражением ЖКТ, был *E. sakazakii*. В одном случае заболевание было осложнено парезом кишечника, пневмонией с развитием ДВС и летальным исходом на 24 день болезни, в другом протекало фульминантно с развитием эксикоза и токсикоза на фоне врожденной ВИЧ-инфекции и наступлением летального исхода на второй день заболевания.

В исследовании было выявлено только по одному случаю развития летального исхода с выявлением в качестве единственных патогенов сальмонелл и термофильных кампилобактерий. У ребенка с сальмонеллезом в возрасте 3 мес. летальный исход наступил на второй день болезни на этапе транспортировки в стационар. Летальный исход на фоне кампилобактериоза был зарегистрирован у ребенка в возрасте 2 лет 4 мес. на пятый день болезни, осложненной развитием инвагинации кишечника.

Среди патогенов бактериальной природы, выявленных в аутопсийном материале, данные генотипирования были доступны для *Salmo-*

*nella enterica* subsp. *enterica*. Из пяти изолированных и генотипированных (PFGE) культур три принадлежали к серотипу Enteritidis (PFGE типа JEGX01.0001/JEGA26/0001 — два изолята и JLGX01.0001/JLGA26.0057 — один изолят) и по одному к серотипу Poona (JLGX01.0001/JLGA26.0001) и Isangi (VKKX01.0009/VKKA26.0005). Распространенность данных генотипов у пациентов в очагах вспышек сальмонеллеза в 2012–2019 гг. была следующей: JEGX01.0001/JEGA26/0001 — 44,4%; JLGX01.0001/JLGA26.0057 и VKKX01.0009/VKKA26.0005 по 0,04% и JLGX01.0001/JLGA26.0001 — 1,79% соответственно.

В нашем наблюдении из 12 случаев выявления пневмонии у детей с неподтвержденными диарейными инфекциями в трех случаях она имела пневмококковую этиологию, в одном случае была ассоциирована с аденовирусами 4 типа и в одном — с генерализованной инфекцией, вызванной *Stenotrophomonas maltophilia*. Пневмококковая инфекция проявлялась в одном случае в виде пневмонии в сочетании с сепсисом, в другом случае — в сочетании с менингоэнцефалитом и в третьем сопровождалась асфиксией вследствие аспирации рвотных масс. Генерализованная инфекция, ассоциированная с *S. maltophilia*, также протекала в форме сепсиса и двусторонней пневмонии. Аденовирусная инфекция, ассоциированная с аденовирусами 4 типа, протекала на фоне декомпенсированного сахарного диабета в форме двусторонней интерстициальной пневмонии и привела к летальному исходу на фоне отека легких.

У детей с развитием летального исхода на фоне инфекционной диареи пневмонии также занимали лидирующие позиции среди сопутствующих патологий, оказывавших влияние на прогноз заболевания. При выявлении пневмонии у 17 из 76 (22%) детей не отмечалось какой-либо ассоциации с определенными нозологиями (в шести случаях ассоциация с выявлением ротавирусов, трех — аденовирусов, по одному случаю — астровирусов, *E. sakazakii* и ЕРЕС и в пяти случаях — с несколькими возбудителями ОКИ).

При патологоанатомическом исследовании в пяти случаях в качестве непосредственной причины летального исхода была диагностирована асфиксия вследствие аспирации рвотных масс. Данное осложнение наблюдалось на сроках до четвертого дня заболевания, в двух из этих случаев — на догоспитальном этапе. Кроме того, в нескольких протоколах патологоанатомических исследований отмечались характерные для аспирационной асфиксии изменения в виде скопления жидкой крови в правых отделах сердца, субплевральных и субэпикардальных кровоизлияний без вынесения заключения о наличии данного осложнения (как правило, при развитии летального исхода в периоде госпитализации).

У двух детей летальный исход развился на фоне ранее диагностированной болезни Гиршпрунга. Клинической особенностью данных случаев являлось развитие пареза кишечника на ранних стадиях болезни, сопровождавшееся быстрым прогрессированием ИТШ. Аналогичная динамика заболевания с развитием пареза кишечника наблюдалась у значительного числа детей.

## Обсуждение

Результаты проведенной работы наглядно демонстрируют условность используемых на практике критериев дифференциальной диагностики инфекционных диарей и необходимость комплексной оценки состояния пациентов для своевременного выявления прогностически значимой патологии.

Формат проведенного исследования не давал возможности оценить распространенность летальных исходов у пациентов с инфекционными диареями в популяции, но позволял провести внутренний анализ данной проблемы. Полученные результаты ни в коем случае не должны рассматриваться как свидетельство различий в частоте регистрации летальных исходов у детей между отдельными субъектами РФ.

К сожалению, особенности учета количества летальных исходов от инфекционных диарей в официальной статистике не только затрудняет объективный анализ проблемы, но и снижает уровень настороженности клинических специалистов в оценке возможности неблагоприятного исхода данных заболеваний. Приведенные наблюдения лишней раз подчеркивают справедливость утверждения инфекционистов «старой школы»: «Мы хорошо знаем, как начинаются кишечные инфекции, но никогда не можем предсказать, чем они закончатся». В отношении детей первых лет жизни, риски развития летального исхода у которых обратно пропорциональны возрасту, это утверждение имеет особую актуальность.

Безусловным поводом для настороженности в оценке прогноза должно являться наличие у ребенка с инфекционной диареей осложненного преморбидного фона. Однако у большей части детей (83%) развитие летального исхода происходило на фоне благополучного анамнеза, который ни в коем случае не должен рассматриваться в качестве гарантии последующего неосложненного течения заболевания и влиять на объективность оценки рисков неблагоприятного исхода.

Высокая доля случаев летального исхода на догоспитальном этапе (24%) и их превалирование в первые сутки госпитализации (54%) при высокой доле пациентов, госпитализированных в первые 48 часов заболевания (35%), указывают на несостоятельность утверждения о том, что до-

ступность своевременной стационарной педиатрической помощи нивелирует прогностические риски для детей. Данный контраргумент часто используется для обоснования утверждения об отсутствии влияния вакцинопрофилактики РВИ на число ассоциированных с ней случаев смерти детей в странах с развитыми системами здравоохранения и обуславливает отсутствие исследований влияния ротавирусных вакцин на детскую смертность на их территориях [2].

Выраженное превалирование ротавирусов в структуре патогенов, выявленных при исследовании аутопсийного материала (у 32% пациентов в качестве единственного патогена и 21% в сочетании с другими возбудителями), подтверждают правомерность характеристики РВИ как наиболее тяжело протекающей из распространенных инфекционных диарей, а случаи скоротечного и непрогнозируемо тяжелого течения данного заболевания указывают на вакцинопрофилактику как единственно эффективный способ их предотвращения [3, 12, 14].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наряду с хорошо описанными в литературе осложнениями инфекционных диарей в виде инфекционно-токсического и гиповолемического шока особого внимания у пациентов с тяжелым течением заболевания требует своевременная диагностика пневмоний, в том числе обусловленных патогенетически — генерализацией процесса с развитием вторичных пневмоний и их возникновением на фоне аспирации рвотных масс [4, 9]. Дальнейшего изучения требует этиология пневмоний при инфекционных диареях, вызванных аденовирусами 40 и 41 типа.

Состояния, сопровождающиеся снижением моторики желудочно-кишечного тракта, в том числе болезнь Гиршпрунга, патология иммунной системы (врожденная ВИЧ-инфекция), также предположительно могут существенно усугублять прогноз при инфекционных диареях у детей первых лет жизни [8]. Несмотря на то, что понятие тимико-лимфатического статуса в настоящее время рассматривается в качестве примера заблуждений в истории медицины, оно продолжает использоваться в отечественной медицинской документации [6, 10].

Частая (у 7 из 76 пациентов с диареями) регистрация ГУС позволяет говорить о необходимости включения обследования на наличие ЕНЕС в рамки базового этиологического скрининга у детей с гемоколитами [6].

Анализ этиологии и факторов риска неблагоприятных исходов при инфекционной патологии у детей младшего возраста является крайне актуальной задачей для медицины нашей страны и требует централизованного подхода в решении в рамках реализации программ здравоохранения на национальном уровне.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов при проведении данного исследования.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность коллегам, оказывавшим содействие в проведении данной работы: Агеевой О.Т., Акимовой Г.И., Бабанину С.Н., Бакушиной Е.Б., Бастракову С.И., Бахтиной Н.В., Безгодову И.В., Беличенко Н.С., Беловой М.В., Бирюковой А.Л., Болдыревой В.В., Болтенкову В.П., Бондареву В.А., Брыциной Т.С., Букушиной Е.Б., Булышевой Л.Н., Бурдинской Е.Н., Бушкинковой Б.Ц., Валеуллиной Н.Н., Васюченко О.М., Вахничкой Д.В., Вендеревской Е.И., Гетман Р.А., Гильденскиольд О.А., Гнативу Б.Р., Говоровой В.Г., Гредюшко О.Н., Гук Э.А., Гурьевой Л.П., Гусевой Ю.В., Дампиловой Е.Г., Дворянкиной Н.В., Дегтяревой И.Н., Деревянко А.В., Джембинову С.Д., Джусоевой М.Р., Донцовой О.Е., Дятчик Н.А., Ершовой С.М., Жуковой А.И., Завьяловой Л.А., Зволибовской А.В., Исаевой И.Н., Казак А.А., Козлову Б.Г., Коновалову В.Ю., Константиновой А.Л., Копытовой Н.И., Короткову В.В., Кошкой Е.Н., Кузьминых М.М., Ливандовской Е.Л., Лукьянцевой С.А., Лучининой С.В., Множиной Е.Г., Нехрюк Т.Ю.,

Овечкиной И.Н., Овсянниковой Л.В., Остапенко Н.А., Пантелееву Г.В., Петросяну Ф.К., Платунину А.В., Пономаревой Л.И., Поповой М.В., Ракизову А.Л., Резаповой А.Р., Романовой Т.Г., Рябининой Т.В., Савельеву С.И., Семенову И.А., Семенову Л.П., Сережкиной Е.А., Соловьевой О.Н., Соломашенко Н.И., Степкину Ю.И., Сыса А.М., Талановой Е.А., Татаринцевой Е.П., Терех А.П., Тихоновой Г.Д., Толкачевой Е.В., Труфанову Н.Д., Тузову О.В., Туранову А.О., Тюриной О.В., Федоровой Е.С., Фроловой О.П., Хакимовой М.И., Хализевой В.А., Харламову М.В., Харькову В.В., Хиштовой Н.С., Хохриной Н.В., Христенко Т.А., Шангиной Н.В., Шапошниковой И.В., Шишко Л.А., Шпанке А.А., Щербановой М.С., Юргинной О.М.

## Сокращения

ЭВИ — энтеровирусная инфекция, ЦНС — центральная нервная система, ОГМ — отек головного мозга, РВИ — ротавирусная инфекция, ИТШ — инфекционно-токсический шок, ГУС — гемолитико-уремический синдром, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, ЕРЕС — энтеропатогенные *E. coli*, ЕТЕС — энтеротоксигенные *E. coli*, ЕНЕС — энтерогеморрагические *E. coli*, ЕІЕС — энтероинвазивные *E. coli*, ЕАgЕС — энтероагрегативные *E. coli*.

## Список литературы/References

1. Паркина Н.В., Сакалкина Е.В., Гусева А.Н., Кулешов К.В., Ольнева Т.А., Гоптарь И.А., Домонова Э.А., Матосова С.В., Сильвейстрова О.Ю., Хромова Н.А., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А. Изучение этиологии заболеваний с летальными исходами у детей в очаге групповой заболеваемости шигеллезом // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 6. С. 311–319. [Parkina N.V., Sakalkina E.V., Guseva A.N., Kuleshov K.V., Olneva T.A., Goptar I.A., Domonova E.A., Matosova S.V., Silveystrova O.Yu., Khromova N.A., Podkolzin A.T., Shipulin G.A. Enhanced investigation of etiology of diseases during the shigellosis outbreak with fatal outcomes among children. *Epidemiologia i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases (Russian Journal)*, 2017, vol. 22, no. 6, pp. 311–319. (In Russ.)] doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-6-311-319
2. Burnett E., Jonesteller C.L., Tate J.E., Yen C., Parashar U.D. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 215, no. 11, pp. 1666–1672. doi: 10.1093/infdis/jix186
3. Burnett E., Parashar U.D., Tate J.E. Global impact of rotavirus vaccination on diarrhea hospitalizations and deaths among children < 5 years old: 2006–2019. *J. Infect. Dis.*, 2020, vol. 222, no. 10, pp. 1731–1739. doi: 10.1093/infdis/jiaa081
4. David N.C. Acute respiratory distress syndrome in children: physiology and management. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2013, vol. 25, no. 3, pp. 338–343. doi: 10.1097/MOP.0b013e328360bbe7
5. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2018, vol. 392, no. 10159, pp. 1736–1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7
6. Goerig M. “Status Thymolymphticus” — a risk of anaesthesia? *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.*, 2019, vol. 54, no. 9, pp. 562–570. doi: 10.1055/a-0989-8769
7. Gould L.H., Bopp C., Strockbine N., Atkinson R., Baselski V., Body B., Carey R., Crandall C., Hurd S., Kaplan R., Neill M., Shea S., Somsel P., Tobin-D'Angelo M., Griffin P.M., Gerner-Smidt P., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recomm. Rep.*, 2009, vol. 58, no. RR-12, pp. 1–14.
8. Guillaume A.W.D., Miller A.C., Nguyen M.C. Enterocolitis in a child with Hirschsprung disease. *Pediatr. Emerg. Care*, 2019, vol. 35, no. 7, pp. e131–e132. doi: 10.1097/PEC.0000000000001108
9. Hu X., Lee J.S., Pianosi P.T., Ryu J.H. Aspiration-related pulmonary syndromes. *Chest*, 2015, vol. 147, no. 3, pp. 815–823. doi: 10.1378/chest.14-1049
10. Konopka T. Erroneous paths of forensic medicine. *Arch. Med. Sadowej Kryminol.*, 2008, vol. 58, no. 2–3, pp. 117–122. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7
11. Lanata C.F., Fischer-Walker C.L., Olascoaga A.C., Torres C.X., Aryee M.J., Black R.E., Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization, Unicef. Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 9: e72788. doi: 10.1371/journal.pone.0072788

12. Riera-Montes M., O'Ryan M., Verstraeten T. Norovirus and rotavirus disease severity in children: systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2018, vol. 37, no. 6, pp. 501–505. doi: 10.1097/INF.0000000000001824
13. WHO. World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: WHO, 2019. 120 p.
14. Xie J., Nettel-Aguirre A., Lee B.E., Chui L., Pang X.L., Zhuo R., Parsons B., Vanderkooi O.G., Tarr P.I., Ali S., Dickinson J.A., Hagen E., Svenson L.W., MacDonald S.E., Drews S.J., Tellier R., Graham T., Lavoie M., MacDonald J., Freedman S.B., Pediatric Emergency Research Canada (PERC) and the Alberta Provincial Pediatric Enteric Infection TEam (APPETITE TEam). Relationship between enteric pathogens and acute gastroenteritis disease severity: a prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2019, vol. 25, no. 4, pp. 454–461. doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.016

**Авторы:**

**Подколзин А.Т.**, д.м.н., зам. директора по эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Кожухметова Т.А.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Касова Д.Х.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Далелова З.Х.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Кулешов К.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Гусева А.Н.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Павлова А.С.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Веселова О.А.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Паркина Н.В.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Коновалова Т.А.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Яцышина С.Б.**, к.б.н., зав. научной группой новых методов диагностики ОРЗ, руководитель Референс-центра по мониторингу за возбудителями инфекций верхних и нижних дыхательных путей ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

**Authors:**

**Podkolzin A.T.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Kozhakhmetova T.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Kyasova D.Kh.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Dalelova Z.Kh.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Kuleshov K.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Guseva A.N.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Pavlova A.S.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Veselova O.A.**, Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Parkina N.V.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Konvalova T.A.**, Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics and Epidemiology of Intestinal Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Yatsyshina S.B.**, PhD (Biology), Head of the Scientific Group of New Methods of Diagnostics of Acute Respiratory Infections, Head of the Reference Center for Monitoring Pathogens of Upper and Lower Respiratory Tract Infections, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation.

# ПОЛУЧЕНИЕ, ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПОДЛИННОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.А. Калошин, Е.М. Зими́на, Е.О. Калиниченко, Н.А. Михайлова

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

**Резюме.** Целью исследования было получение и характеристика рекомбинантной вакцины, предназначенной для иммунопрофилактики инфекций, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*. При создании вакцины использован комплекс двух высокоиммуногенных рекомбинантных белков *P. aeruginosa*. Первый компонент вакцины представлял собой рекомбинантную форму белка F наружной мембраны (OprF), а второй — рекомбинантную атоксическую форму (анатоксин) экзотоксина А. Эти антигены позволили разработать вакцину, стимулирующую иммунные реакции против поверхностных структур бактерии и способствующую синтезу нейтрализующих антител против экзотоксина А, одного из наиболее опасных факторов патогенности *P. aeruginosa*. Рекомбинантные белки синтезировали в клетках *Escherichia coli* и выделяли в результате двухэтапной очистки. В случае рекомбинантного белка OprF на первом этапе получали осадок, содержащий гидрофобную фракцию белков продуцента, а в случае рекомбинантного анатоксина — тельца-включения. На втором этапе проводили аффинную хроматографию в колонках с никель-сефарозой. Очищенные рекомбинантные белки диализовали против буферного раствора, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) и 0,01% Tween 20, а затем стерилизовали фильтрацией. Для исследования были получены три серии рекомбинантной вакцины синегнойной (PBC), в которой рекомбинантные антигены находились в сорбированном с гидроокисью алюминия состоянии. В этой вакцине рекомбинантный белок OprF использовали в дозе 25 мкг, а рекомбинантный анатоксин — в дозе 50 мкг. Определение полноты сорбции рекомбинантных антигенов в составе вакцины оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле, используя для нанесения препараты PBC, сконцентрированные ультрафильтрацией в спин-колонках. С целью оценки подлинности рекомбинантной вакцины разработали оригинальный метод. Для этого проводили десорбцию антигенов с последующей концентрацией препарата с помощью спин-колонок. Полученные сконцентрированные десорбированные вакцинные препараты анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттингом, в результате чего подтверждено наличие специфических рекомбинантных антигенов в составе вакцины. Экспериментальные серии PBC проявляли специфическую активность (защитные свойства) в эксперименте на животных (мышах). При этом использована схема двукратной, с двухнедельным интервалом внутрибрюшинной иммунизации, через две недели после которой мышей заражали токсигенной культурой *P. aeruginosa* штамма PA-103. Индексы эффективности защитных

## Адрес для переписки:

Калошин Алексей Алексеевич  
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А,  
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.  
Тел.: 8 (965) 136-51-45 (моб.), 8 (495) 916-25-87 (служебн.).  
Факс: 8 (495) 917-54-60.  
E-mail: alex-k-1973@yandex.ru

## Contacts:

Alexei A. Kaloshin  
105064, Russian Federation, Moscow, Malyi Kazennyi lane, 5A,  
Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.  
Phone: +7 (965) 136-51-45 (mobile), 8 (495) 916-25-87 (office).  
Fax: +7 (495) 917-54-60.  
E-mail: alex-k-1973@yandex.ru

## Для цитирования:

Калошин А.А., Зими́на Е.М., Калиниченко Е.О., Михайлова Н.А. Получение, оценка специфической активности и подлинности рекомбинантной вакцины, предназначенной для профилактики синегнойной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 763–770. doi: 10.15789/2220-7619-OES-1369

## Citation:

Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A. Generation and evaluation of specific activity and authenticity of recombinant vaccine designed preventing against *Pseudomonas aeruginosa* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 763–770. doi: 10.15789/2220-7619-OES-1369

свойств (ИЭ) экспериментальных серий вакцины составляли не менее трех (ИЭ: 3,0–3,3), что превышало в полтора раза эффективность использования компонентов вакцины по отдельности (ИЭ: 2,0–2,3). Таким образом, подтвержден аддитивный эффект использования комплексного препарата для защиты от инфицирования токсигенными штаммами синегнойной палочки.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), анатоксин, рекомбинантный белок, рекомбинантная вакцина.

## GENERATION AND EVALUATION OF SPECIFIC ACTIVITY AND AUTHENTICITY OF RECOMBINANT VACCINE DESIGNED PREVENTING AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A.

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

**Abstract.** The aim of the study was to obtain and characterize a recombinant vaccine for the immunoprophylaxis of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. A set of two highly immunogenic *P. aeruginosa* recombinant proteins was used to create related vaccine. The first vaccine component was presented by recombinant outer membrane protein F (OprF), whereas the second one — by recombinant atoxic exotoxin A (toxoid). These antigens allowed to develop vaccine inducing immune response against the surface bacterial cues and promote production of neutralizing antibodies against exotoxin A, one of the most dangerous *P. aeruginosa* pathogenicity factors. Recombinant proteins were synthesized in *Escherichia coli* cells and isolated by two-step purification. In case of recombinant OprF protein, it was initially (stage 1) isolated as a precipitate containing hydrophobic fraction of producer cell-derived proteins, whereas for recombinant toxoid we purified inclusion bodies. At stage 2, a Ni Sepharose column affinity chromatography was performed. Next, purified recombinant proteins were dialyzed against buffer solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) and 0.01% Tween 20 followed by filtration sterilization. Three lots of the *Pseudomonas* Recombinant Vaccine (PRV) were obtained for the study, wherein the recombinant antigens were absorbed with aluminum hydroxide. Recombinant OprF and toxoid protein in vaccine formula were used at a dose of 25 µg and 50 µg, respectively. Absorption completeness of the recombinant antigens within the vaccine was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis with PRV preparations concentrated by ultrafiltration in spin columns. Authenticity of recombinant vaccine was assessed by using customized method by desorbing antigens followed by ultrafiltration concentration in spin columns. Final concentrated desorbed vaccine preparations were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting, which allowed to confirm presence of specific recombinant antigens in the vaccine. The experimental PRV series demonstrated specific activity (protective properties) after inoculation in animals (mice) by using a dual vaccination protocol, wherein mice were immunized intraperitoneally twice with a two-week interval. Next, two weeks later mice were infected by toxigenic *P. aeruginosa* strain PA-103 culture cells. The index of protective efficiency (IE) for experimental vaccine series was at least a value of three (IE: 3.0–3.3) that was by 1.5-fold higher than that for using single vaccine components (IE: 2.0–2.3). Thus, we confirmed an additive effect of using a set preparation to protect against infection caused by toxigenic *Pseudomonas aeruginosa* strains.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane protein F (OprF), toxoid, recombinant protein, recombinant vaccine.

## Введение

*Pseudomonas aeruginosa* — условно патогенный микроорганизм, вызывающий гнойно-воспалительные заболевания человека и животных. Обычно синегнойная инфекция развивается как осложнение вследствие ослабления иммунной системы организма, что может быть вызвано различными видами травм и перенесенными заболеваниями. Поскольку *P. aeruginosa* неприхотлива к питательным веществам и обладает высокой устойчивостью к факторам внешней среды и лекарственным препаратам, в том числе и к антибиотикам, синегнойные инфекции имеют широкое распространение в медицинских стационарах [3, 10].

Для иммунопрофилактики гнойно-воспалительных инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, может использоваться активная иммуни-

зация [11]. Ранее рассматривалась перспектива создания вакцин на основе материала, полученного после культивирования производственных штаммов *P. aeruginosa*. В частности, была разработана цельноклеточная инактивированная вакцина, содержащая семь штаммов основных иммунотипов *P. aeruginosa* [8]. Однако такая вакцина не нашла применения в медицинской практике из-за высокой токсичности. Позднее были предприняты попытки получения вакцин на основе разрушенных микробных клеток [1, 7]. Но несмотря на высокую иммуногенность и эффективность этих препаратов, не удалось полностью избавиться от реактогенности, обусловленной примесью липополисахарида клеточной стенки бактерии.

Перспективными оказались препараты на основе очищенных мембранных белков, которые обладали выраженными протективными свой-

ствами и характеризовались отсутствием токсичности [4, 14]. Известны исследования препаратов анатоксинов — химически детоксицированных препаратов экзотоксина А, который является одним из основных факторов патогенности синегнойной палочки [5]. Анатоксин использовали с целью получения донорской плазмы, которая оказалась высокоэффективной при лечении генерализованных форм заболеваний, вызываемых *P. aeruginosa* [6]. Подобные субъединичные вакцины не получили широкого распространения в практике здравоохранения, что связано со сложностью технологического процесса очистки целевых протективных антигенов, а кроме того, с тем, что в случае получения анатоксина остается вероятность реверсии токсичности. Выходом из этой ситуации является использование рекомбинантных белков.

Ранее нами получены и изучены рекомбинантный белок F наружной мембраны (OprF) [12] и рекомбинантная атоксическая форма экзотоксина А (анатоксина) [13]. Комплекс этих рекомбинантных антигенов, сорбированных на геле гидроокиси алюминия, защищал мышей от экспериментальной синегнойной инфекции и проявлял аддитивный эффект [2].

## Материалы и методы

**Синтез рекомбинантных антигенов.** При получении рекомбинантных белков использовали штаммы-продуценты рекомбинантного белка OprF *Escherichia coli* [12] и рекомбинантного анатоксина [13] из коллекции лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. При культивировании первого продуцента использовали LB-среду, содержащую ампициллин в концентрации 100 мкг в мл и канамицин в концентрации 50 мкг в мл, а при культивировании второго продуцента — LB-среду, содержащую только канамицин в концентрации 50 мкг в мл. Штаммы-продуценты рассевали на агаризованной LB-среде в чашках Петри. Выращенные одиночные колонии после ночной инкубации (12–16 ч) при температуре 37°C использовали для инокуляции 250 мл жидкой среды. Культуру выращивали в термостатированном шейкере в течение 12 ч при температуре 37°C, после чего ее вносили в 2 л свежей LB-среды и инкубировали в прежних условиях в течение 2–3 ч до значения оптической плотности ( $OD_{600}$ ) 0,5. Добавляли 2 мл 1 М ИПТГ и продолжали инкубацию в прежних условиях 3,5 ч. Полученную биомассу осаждали центрифугированием. Осадок собирали и замораживали.

**Получение телец-включений.** Осадок бактериальной биомассы, полученной из 10 л культуральной среды, размораживали и растворяли в 300 мл литического буфера (фосфатно-солевой

буфер, 5 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанола). Суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции на приборе 130-Watt Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, США) в режиме максимальной мощности трижды по 30 с. Нерастворившуюся фракцию осаждали в центрифуге Avanti J-E с ротором JA-14 (Beckman Coulter, США) 20 мин при скорости 5000 об/мин и температуре 4°C, а затем удаляли супернатант. Полученный осадок растворяли в 300 мл раствора следующего состава: 10 ммоль NaCl, 6 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 10 ммоль CaCl<sub>2</sub>, 40 мМ Tris-HCl, pH 8,0, добавляли 6 мкл РНКазы А (10 мг/л) и 15 мкл ДНКазы I (10 мг/мл) и инкубировали 15 мин при температуре 37°C. Повторяли ультразвуковую дезинтеграцию вышеописанным способом. Суспензию центрифугировали 20 мин при скорости 5000 об/мин и температуре 4°C с последующим удалением супернатанта. Осадок трижды промывали следующим образом: ресуспендировали в 100 мл промывочного буфера (фосфатно-солевой буфер, 5 мМ ЭДТА, 20% сахарозы, 1% Triton X-100) и инкубировали 10 мин при температуре 4°C, а затем центрифугировали 20 мин при скорости 5000 об/мин и температуре 4°C. Супернатант удаляли и собирали осадок.

**Получение гидрофобной фракции бактериальных белков.** Осадок бактериальной биомассы, полученной из 10 л культуральной среды, размораживали и растворяли в 210 мл буфера, содержащего 0,3 М NaCl, 0,02 М MgCl<sub>2</sub>, 0,04 М Tris-HCl (pH 8,0). Далее добавляли 250 мкл раствора ДНКазы (10 мг/мл) и 70 мг лизоцима и инкубировали 30 мин при температуре 4°C. Затем добавляли 168 мл 10% раствора Triton X-100 и интенсивно перемешивали. Осаждали нерастворимую фракцию на центрифуге Beckman Avanti J-E (ротор JA-14) при 5000 об/мин и при температуре 4°C в течение 20 мин, а затем удаляли супернатант.

**Хроматографическая очистка.** Осадок гидрофобной фракции или осадок телец-включений растворяли в одном литре буфера следующего состава: 8 М мочевины, 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0. Растворение осуществляли в орбитальном шейкере со скоростью вращения 70 об/мин в течение 12 ч при комнатной температуре. Затем проводили осаждение нерастворимой фракции лизата, используя центрифугу Beckman Avanti J-E (ротор JA-14), со скоростью вращения 10 000 об/мин при комнатной температуре в течение часа. К супернатанту добавляли 20–25 мл суспензии Ni-сефарозы (GE Healthcare, США) и инкубировали 1 час при комнатной температуре в орбитальном шейкере с легким покачиванием (60 об/мин). Полученную суспензию пропускали самотеком через хроматографическую колонку (Bio-Rad, США). После прохождения почти всей жидкой фазы колонку подключали к хроматогра-

фу (BioLogic LP, Bio-Rad) и пропускали два литра первого промывочного раствора (8 М мочевины, 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 М Tris-HCl, pH 6,3) и 500 мл второго промывочного раствора (8 М мочевины, 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 М Tris-HCl, pH 5,9). Элюцию рекомбинантного белка осуществляли буферным раствором следующего состава: 8 М мочевины; 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 М Tris-HCl, pH 4,5.

**Диализ и стерилизация.** Перед проведением диализа pH растворов рекомбинантных белков доводили до значения 9,0 насыщенным раствором гидроксида натрия. Препараты рекомбинантных белков переносили в диализные мешки — целлюлозные диализные мембраны с размером пор для белков с молекулярным весом 14 kDa (Sigma, США). Диализные мешки с препаратами рекомбинантных белков помещали в емкость, содержащую буфер следующего состава: 50 mM раствор Tris-HCl (pH 9,0), 0,01% Tween 20. Объем препаратов рекомбинантных белков в диализном мешке и объем буфера для диализа имели соотношение 1:10. Диализ проводили в холодильном боксе с температурой 2–8°C на мешалке при постоянном перемешивании раствора магнитным перемешивающим элементом. Смену буфера осуществляли пять раз каждые 4 часа. Буферный раствор для пятой (финальной) смены готовили на апиrogenной воде. После диализа проводили стерилизующую фильтрацию препаратов рекомбинантных белков с использованием полисульфоновых фильтров с диаметром пор 0,22 мкм (Sartorius, Германия). После стерилизации препараты хранили при температуре 2–8°C. Концентрацию белков определяли на спектрофотометре Genesys 6 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 280 нм.

**Оценка специфичности рекомбинантных белков.** При анализе рекомбинантных белков использовали методы электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга [15]. В иммуноблоттинге использовали специфические сыворотки крови кроликов, полученные к рекомбинантному белку OprF [12] и рекомбинантному анатоксину [13] из коллекции лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

**Сведение компонентов вакцины.** Препараты рекомбинантных антигенов и гель гидроксида алюминия переносили в стерильную бутылку и доводили объем стерильным физиологическим раствором хлорида натрия. Затем в бутылку помещали стерильный магнитный перемешивающий элемент и герметично закрывали крышку. Сорбцию антигена проводили в холодильном боксе с температурой 2–8°C на магнитной мешалке со скоростью вращения 60–100 об/мин в течение 12 ч. Сорбированный препарат разливали в стерильные флаконы, укупоривали и хранили при температуре 2–8°C.

**Оценки стерильности** проводили в соответствии с требованиями «Государственной фармакопеи РФ» [9].

**Десорбция вакцины.** Флакон с вакциной встряхивали, вскрывали и переносили одну дозу (0,5 мл) в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5–2,0 мл. Добавляли 1 мл буферного раствора следующего состава: 0,45 М цитрат натрия, 0,4 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,0. Встряхивали пробирку на вортексе и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Затем перенесли содержимое в центрифужную ультрафильтрационную колонку Millipore объемом 15 мл с размером пор мембраны 10 kDa. Проводили центрифугирование в настольной центрифуге Eppendorf 5702 (Eppendorf, Германия) при скорости вращения 2500 об/мин в течение 15–20 мин до достижения объема 100 мкл. Полученный препарат использовали для анализа подлинности компонентов рекомбинантной вакцины.

**Оценка защитных свойств.** Для иммунизации использовали самок белых беспородных мышей весом 16–18 г. При экспериментальном инфицировании животным внутрибрюшинно вводили различные дозы живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* штамма PA-103 в объеме 0,5 мл. Для этого колонии *P. aeruginosa*, выращенные на агаризованной среде Мюллера–Хинтона, смывали изотоническим раствором хлорида натрия и разводили до концентрации  $10^9$  КОЕ (число образующих колонии бактерий) в 1 мл, используя стандарты мутности и спектрофотометр. Из полученной взвеси готовили дозы заражения различной концентрации, осуществляя контроль путем посева на агаризованную среду взвеси культуры, соответствующей минимальной дозе заражения, с последующим подсчетом образовавшихся колоний. Статистическую обработку результатов — определение ЛД<sub>50</sub> в опытных и контрольных группах, а также индекса эффективности (ИЭ) — проводили общепринятыми методами.

## Результаты

### *Получение рекомбинантных антигенов.*

На первом этапе синтезировали по три серии препаратов рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина, при этом используемым штаммам-продуцентам *E. coli* присвоили название PA-OPRF и PA-ATOX. При синтезе одной серии рекомбинантного белка OprF культивирование проводили в 10 л жидкой среды, а при синтезе рекомбинантного анатоксина — в 20 л жидкой среды.

С целью получения высокоочищенных рекомбинантных белков мы использовали методы их предварительной очистки до хроматографии. При очистке рекомбинантного анатоксина по-

лучали тельца-включения. В то же время рекомбинантный белок OprF после ультразвуковой обработки растворялся и не формировал тельца-включения. Поэтому для его очистки был разработан так называемый «метод получения гидрофобной фракции бактериальных белков», который заключался в ферментативном лизисе бактериальных клеток с обработкой нуклеазами и последующим центрифугированием. Нерастворимый в воде осадок использовали для хроматографической очистки. В итоге после очистки в колонках с никель-сефарозой получены по три серии обоих рекомбинантных белков.

При оценке подлинности препаратов рекомбинантных белков методом электрофореза в полиакриламидном геле определены продукты с размерами около 40 kDa для OprF и около 65 kDa для анатоксина, что соответствовало расчетным параметрам (рис. 1, вклейка, с. II). В иммуноблоттинге эти рекомбинантные белки реагировали со специфическими кроличьими антисыворотками (рис. 2, вклейка, с. II).

После диализа препараты рекомбинантных белков стерилизовали фильтрованием. В тестах по оценке стерильности компонентов вакцины не наблюдали роста посторонней микрофлоры ни в одном опытном образце.

**Получение экспериментальных серий вакцины и их качественная характеристика.** При сведении компонентов вакцины для одной дозы объемом 0,5 мл использовали 25 мкг рекомбинантного белка OprF, 50 мкг рекомбинантного анатоксина и 225 мкг гидроокиси алюминия. После проведения процесса сорбции вакцину разлили в пенициллиновые флаконы и укупили. В результате были получены три экспериментальные серии вакцины, которые заложены на хранение с целью проведения доклинических исследований и оценки стабильности показателей качества.

Один из важных этапов производства вакцины — это анализ ее подлинности, что определяется наличием самих компонентов — рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина. Однако рекомбинантные белки в вакцине связаны с гидроокисью алюминия. Кроме того, компоненты находятся в разбавленном состоянии, что затрудняет их детекцию. Поэтому были отработаны методы десорбции компонентов вакцины с последующей концентрацией препарата ультрафильтрацией.

Сконцентрированные десорбированные препараты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле. Одновременно проводили анализ полноты сорбции рекомбинантных антигенов в составе вакцины, для чего также проводили концентрацию ультрафильтрацией препаратов вакцины без десорбции. Препараты трех экспериментальных серий вакцины не во-

дили в полиакриламидный гель во время электрофореза. В то же время в аналогичных десорбированных препаратах идентифицировались рекомбинантный белок OprF и рекомбинантный анатоксин (рис. 3, вклейка, с. II).

При оценке подлинности вакцины в иммуноблоттинге в препаратах при анализе с антисывороткой к рекомбинантному белку OprF наблюдали специфические бэнды, как в опыте, так и в контроле. Аналогичные результаты получены при иммуноблоттинге с антисывороткой к рекомбинантному анатоксину (рис. 4, вклейка, с. II).

**Исследование защитных свойств рекомбинантных антигенов и вакцины.** Предварительно перед приготовлением экспериментальных серий вакцины рекомбинантные антигены всех серий исследовали на предмет защитных свойств от экспериментальной синегнойной инфекции. При исследовании рекомбинантного белка OprF использовали дозу 25 мкг, а при исследовании рекомбинантного анатоксина — дозу 50 мкг, то есть те же дозы компонентов, что и в составе вакцины. В качестве адьюванта использовали гель гидроокиси алюминия, который добавлялся в соотношении 3:1 к массе рекомбинантного белка. Объем довели физиологическим раствором из расчета 0,5 мл на одну дозу. Проводили двукратную иммунизацию с интервалом 2 недели с последующим через две недели внутрибрюшинным заражением *P. aeruginosa* штамма PA-103.

**Таблица 1. Защитные свойства препаратов рекомбинантных белков серии № 1**

Table 1. Protection by the preparations of recombinant proteins, lot No. 1

Препарат Preparation	Доза заражения, КОЕ* Infection dose, CFU*	Количество мышей павших/ выживших Number of died/ survived mice	LD <sub>50</sub> КОЕ* LD <sub>50</sub> CFU*	ИЭ** IE**
<b>OprF, серия № 1</b> OprF, lot No.1	10 <sup>8</sup>	8/2	33,0	2,0
	5,0 × 10 <sup>7</sup>	7/3		
	2,5 × 10 <sup>7</sup>	5/5		
	12,5 × 10 <sup>6</sup>	1/9		
<b>Анатоксин, серия № 1</b> Toxoid, lot No.1	10 <sup>8</sup>	9/1	33,0	2,0
	5,0 × 10 <sup>7</sup>	7/3		
	2,5 × 10 <sup>7</sup>	5/5		
	12,5 × 10 <sup>6</sup>	0/10		
<b>Контроль (интактные мыши)</b> Control (intact mice)	5,0 × 10 <sup>7</sup>	10/0	16,5	-
	2,5 × 10 <sup>7</sup>	7/3		
	12,5 × 10 <sup>6</sup>	3/7		
	6,3 × 10 <sup>6</sup>	1/9		
	3,1 × 10 <sup>6</sup>	0/10		

**Примечание.** \*КОЕ — колониеобразующие единицы, \*\*ИЭ — индекс эффективности.

Note. \*CFU — colony forming units, \*\*IE — index of efficiency.

После курса иммунизации мышам опытных групп вводили от  $6,3 \times 10^6$  до  $10^8$  КОЕ культуры *P. aeruginosa*. Животных контрольных групп (мышь той же партии, которым вводили физиологический раствор хлорида натрия) заражали дозами от  $3,1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^7$  КОЕ культуры. Значение индексов эффективности защитных свойств (ИЭ) было не менее 2,0 (табл. 1 и 2), что соответствовало заданным параметрам. В аналогичном опыте по исследованию опытных серий вакцины индексы эффективности защитных свойств соответствовали для серии 1 — 3,3, для серии 2 — 3,0 и для серии 3 — 3,3 (табл. 3).

## Обсуждение

Предварительно нами определен оптимальный состав рекомбинантной вакцины для профилактики синегнойной инфекции, которая способствует стимуляции иммунных реакций

**Таблица 2. Защитные свойства препаратов рекомбинантных белков серий № 2 и № 3**

Table 2. Protection by the preparations of recombinant proteins, lots No. 2 and No. 3

Препарат Preparation	Доза заражения, КОЕ* Infection dose, CFU*	Количество мышей павших/выживших Number of died/survived mice	ЛД <sub>50</sub> , КОЕ* LD <sub>50</sub> , CFU*	ИЭ** IE**
OprF, серия № 2 OprF, lot No.2	$10^8$	10/0	28,8	2,1
	$5,0 \times 10^7$	6/4		
	$2,5 \times 10^7$	5/5		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
OprF, серия № 3 OprF, lot No.2	$10^8$	9/1	26,8	2
	$5,0 \times 10^7$	7/3		
	$2,5 \times 10^7$	5/5		
	$12,5 \times 10^6$	3/7		
Анатоксин, серия № 2 Toxoid, lot No.2	$10^8$	9/1	30,8	2,3
	$5,0 \times 10^7$	7/3		
	$2,5 \times 10^7$	4/6		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
Анатоксин, серия № 3 Toxoid, lot No.3	$10^8$	10/0	28,7	2,1
	$5,0 \times 10^7$	8/2		
	$2,5 \times 10^7$	3/7		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
Контроль (интактные мыши) Control (intact mice)	$5,0 \times 10^7$	10/0	13,4	-
	$2,5 \times 10^7$	8/2		
	$12,5 \times 10^6$	4/6		
	$6,3 \times 10^6$	2/8		
	$3,1 \times 10^6$	0/10		

Примечание. \*КОЕ — колониеобразующие единицы, \*\*ИЭ — индекс эффективности.

Note. \*CFU — colony forming units, \*\*IE — index of efficiency.

к мажорному поверхностному белку бактериальной клетки и одному из основных факторов патогенности *P. aeruginosa*. Оптимальные дозы антигенов комплексного препарата составили 25 мкг для рекомбинантного белка OprF и 50 мкг для рекомбинантного анатоксина, которые были сорбированы на геле гидроокиси алюминия. Оптимальная схема иммунизации данным препаратом включала в себя два введения с двухнедельным интервалом [2].

Во всех предыдущих исследованиях, посвященных получению и изучению разнообразных протективных антигенов, использовали одностадийную хроматографическую очистку на никель-активированных сорбентах. Однако для получения максимально очищенных компонентов вакцины мы предварительно отделяли основную белковую фракцию бактерий от большей части липополисахарида и нуклеиновых кислот. Рекомбинантный анатоксин обладал сильными гидрофобными свойствами, что позволило ему формировать тельца-включения, которые и использовались для хроматографической очистки. Этот подход оказался

**Таблица 3. Защитные свойства экспериментальных серий рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС)**

Table 3. Protection by the experimental lots of recombinant vaccine pseudomonas (RVP)

Препарат Preparation	Доза заражения, КОЕ* Infection dose, CFU*	Количество мышей павших/выживших Number of died/survived mice	ЛД <sub>50</sub> , КОЕ* LD <sub>50</sub> , CFU*	ИЭ** IE**
РВС, серия № 1 RVP, lot No.1	$10^8$	7/3	66	3,3
	$5,0 \times 10^7$	2/8		
	$2,5 \times 10^7$	2/8		
	$12,5 \times 10^6$	0/10		
РВС, серия № 2 RVP, lot No.2	$10^8$	7/3	61,6	3
	$5,0 \times 10^7$	3/7		
	$2,5 \times 10^7$	2/8		
	$12,5 \times 10^6$	0/10		
РВС, серия № 3 RVP, lot No.3	$10^8$	6/4	66	3,3
	$5,0 \times 10^7$	3/7		
	$2,5 \times 10^7$	1/9		
	$12,5 \times 10^6$	1/9		
Контроль (интактные мыши) Control (intact mice)	$5,0 \times 10^7$	10/0	20,3	-
	$2,5 \times 10^7$	6/0		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
	$6,3 \times 10^6$	0/10		
	$3,1 \times 10^6$	0/10		

Примечание. \*КОЕ — колониеобразующие единицы, \*\*ИЭ — индекс эффективности.

Note. \*CFU — colony forming units, \*\*IE — index of efficiency.

неудачным в случае рекомбинантного белка OprF. Однако после лизиса клеток лизоцимом и деградации бактериальной ДНК рекомбинантный белок OprF оказался в нерастворимой форме, поэтому удалось его отделить и также использовать для второго этапа очистки.

Подлинность рекомбинантных антигенов как на стадии получения компонентов вакцины, так и при оценке качества самой вакцины определяли методами электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга. Расчетная молекулярная масса рекомбинантного белка OprF составляла 38,9 kDa, а молекулярная масса рекомбинантного анатоксина — 65,8 kDa. Рекомбинантные белки соответствующих размеров обнаруживались при анализе продуктов очистки (рис. 1 и 3). Другим показателем подлинности рекомбинантных белков является их специфическое взаимодействие с иммунными сыворотками к охарактеризованным препаратам рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина (рис. 2 и 4).

С целью анализа подлинности вакцины разработан оригинальный метод десорбции рекомбинантной вакцины. Основные методы контроля вакцинных препаратов описаны в XIII издании «Государственной фармакопеи РФ», однако при создании новых препаратов авторы уделяют внимание разработке методов определения подлинности и специфической активности. Подлинности разрабатываемой вакцины определяется путем идентификации рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина, которые труднодоступны из-за того, что они находятся в связанном с гелем гидроксида алюминия состоянии, поэтому были подобраны условия их десорбции. Обычно при определении компонентов вакцины используют иммуноферментный анализ, для чего проводится десорбция, в частности в цитратном буфере [16]. В своей работе мы сочетали десорбцию вак-

цины с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле и иммуноблоттингом, что позволило выявлять качество рекомбинантных антигенов вакцины. При этом мы столкнулись с проблемой низких концентраций целевых рекомбинантных антигенов на стадии детекции. Выходом из этого стало концентрирование десорбированных препаратов с помощью ультрацентрифугирования.

При анализе специфической активности вакцины использовали модель экспериментального заражения мышей высоковирулентным штаммом синегнойной палочки PA-103, который характеризуется наличием всех основных факторов патогенности, свойственных клиническим изолятам. Выявлено, что вакцина успешно защищала иммунизированных животных, при этом индексы эффективности экспериментальных серий составляли 3,0–3,3. Эти значения в полтора раза превышали индексы эффективности, полученные в экспериментах по оценке протективных свойств отдельных рекомбинантных белков всех серий, значения которых составляли 2,0–2,3. Полученные результаты экспериментов подтверждают правильность выбранной стратегии, когда хорошо проявлялся аддитивный эффект сочетанного использования протективных антигенов.

## Благодарности

Работа выполнена в соответствии с государственным контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

## Список литературы/References

1. Благовидов Д.А., Костинов М.П., Симонова О.И., Шмитко А.Д., Буркина Н.И., Шахназарян М.К. Переносимость вакцины против *P. aeruginosa* у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития легких // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 15, № 2 (87). С. 55–66. [Blagovidov D.A., Kostinov M.P., Simonova O.I., Shmit'ko A.D., Burkina N.I., Shahnazaryan M.K. The tolerability of the vaccine against *P. aeruginosa* in children with cystic fibrosis and congenital lung development. *Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 55–66. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2016-15-2-55-66
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны и рекомбинантного анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* // Вестник Российской академии медицинских наук. 2016. Т. 71, № 1. С. 17–22. [Kaloshin A.A., Leonova E.I., Soldatenkova A.V., Mikhailova N.A. Assessment protective properties of the recombinant complex of the outer membrane protein F and the toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*. *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2016, vol. 71, no. 1, pp. 117–122. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn584
3. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015. Т. 17, № 3. С. 170–186. [Lazareva A.V., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, vol. 17, no. 3, pp. 170–186. (In Russ.)]

4. Макаренко Т.А., Станиславский Е.С. Иммунологическое изучение белков клеточной стенки *Pseudomonas aeruginosa* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1996. № 2. С. 7–9. [Makarenko T.A., Stanislavskii E.S. An immunological study of the cell-wall proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1996, no. 2, pp. 7–9. (In Russ.)]
5. Патент № 1481962 С Российская Федерация, МПК. А61К 35/74. Способ обезвреживания очищенного экзотоксина А синегнойной палочки; заявлено 1987.07.15; опубликовано 1995.09.06 / Михайлова Н.А., Шаймухаметов Ф.А., Кузнецова Т.Н., Мороз А.Ф. Патентообладатель: УфНИИВС им. И.И. Мечникова, ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. 3 с. [Patent No. 1481962 С Russian Federation, Int. Cl. А61К 35/74. Method for rendering harmless exotoxin А of *Pseudomonas aeruginosa*; application: 1987.07.15; date of publication 1995.09.06 / Mikhailova N.A., Shajmukhametov F.A., Kuznetsova T.N., Moroz A.F. Proprietors: Ufimskij nauchno-issledovatel'skij institut vakcin i syvorotok im. I.I. Mechnikova (UfNIIVS im. I.I. Mechnikova), Nauchno-issledovatel'skij institut jepidemiologii i mikrobiologii im. N.F. Gamalei (GU NIIEМ im. N.F. Gamalei). 3 p.]
6. Подгорная Л.Г., Дзюбан Н.Ф. Антигенные свойства анатоксина синегнойной палочки и протективное действие антитоксической противосинегнойной сыворотки // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1986. № 6. С. 67–69. [Podgornaia L.G., Dziuban N.F. Antigenic properties of *Pseudomonas aeruginosa* anatoxin and the protective action of antitoxic anti-*Pseudomonas aeruginosa* serum. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1986, no. 6, pp. 67–69. (In Russ.)]
7. Станиславский Е.С., Йоо И., Северцева М.К., Машилова Г.М., Болтуцкий Л.Г. Иммунологическая эффективность и безвредность в эксперименте проиммуногена-вакцины против инфекции *Pseudomonas aeruginosa* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1982. № 5. С. 70–75. [Stanislavskii E.S., Joó I., Severtsova M.K., Mashilova G.M., Boltutsii L.G. Experimental immunological effectiveness and safety of pyoimmunogen vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1982, no. 5, pp. 70–75. (In Russ.)]
8. Титова Т.И., Сидорова Т.Н., Радкевич С.А., Анциферова Н.Г., Мороз А.Ф. Получение и изучение свойств поливалентной корпускулярной синегнойной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1985. № 8. С. 80–88. [Titova T.I., Sidorova T.N., Radkevich S.A., Antsiferova N.G., Moroz A.F. Production and study of the properties of a polyvalent corpuscular *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1985, no. 8, pp. 80–88. (In Russ.)]
9. Фармакопей.рф: сайт о регистрации лекарственных средств в России. Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. [Pharmacopoeia.ru: site about registration of drugs in Russia and EAEU (CIS). General pharmacopoeia monograph GPM.1.2.4.0003.15 Sterility]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0003-15-sterilnost-3> (10.12.2019)
10. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L., Mohan G., Biswas R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2016, vol. no. 1, pp. 48–58. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.11.004
11. Döring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 8, pp. 1011–1024. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.12.007
12. Kaloshin A.A., Gatyrova E.V., Mikhailova N.A. Obtaining recombinant forms of the outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* and assessment of their immunogenic properties. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2011, vol. 47, no. 8, pp. 780–788. doi: 10.1134/S0003683811080060
13. Kaloshin A.A., Isakov M.A., Mihailova N.A., Vertiev Ju.V. Preparation of recombinant atoxic form of exotoxin a from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Exper. Biol. Med.*, 2013, vol. 154, no. 3, pp. 346–350. doi: 10.1007/s10517-013-1947-1
14. Lee N.G., Jung S.B., Ahn B.Y., Kim Y.H., Kim J.J., Kim D.K., Kim I.S., Yoon S.M., Nam S.W., Kim H.S., Park W.J. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. *Vaccine*, 2000, vol. 18, no. 18, pp. 1952–1961. doi: 10.1016/S0264-410X(99)00479-X
15. Sambrook J.F., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001. 2100 p.
16. Shanmugham R., Thirumeni N., Rao V.S., Pitta V., Kasthuri S., Singanallur N.B., Lingala R., Mangamoori L.N., Villuppanoor S.A. Immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay for assessment of in vitro potency of recombinant hepatitis B vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, vol. 17, no. 8, pp. 1252–1260. doi: 10.1128/CVI.00192-10

**Авторы:**

**Калошин А.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

**Зими́на Е.М.**, младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

**Калиниченко Е.О.**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

**Михайлова Н.А.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

**Authors:**

**Kaloshin A.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Protective Antigens, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

**Zimina E.M.**, Junior Researcher, Laboratory of Protective Antigens, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

**Kalinichenko E.O.**, PhD Student, Junior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

**Mikhailova N.A.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Protective Antigens, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.01.2020

Принята к печати 16.05.2020

Received 31.01.2020

Accepted 16.05.2020

# АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ

Е.С. Гудкова, Е.С. Удегова, К.А. Гильдеева, Т.В. Рукосуева, Б. Съед

ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Быстрое формирование устойчивости микроорганизмов к современным антибактериальным препаратам требует поиска все новых, альтернативных методов терапии. Известно, что некоторые организмы, например растения, водоросли, грибы, способны превращать ионы неорганических металлов в металлические наночастицы за счет процесса восстановления, осуществляемого белками, сахарами и метаболитами, содержащимися в тканях и клетках этих организмов. Вместе с тем многие растения (подорожник, тысячелистник, полынь, куркума длинная, календула, багульник болотный и т. д.) и металлы (медь, серебро, золото, цинк и т. д.) сами по себе обладают антибактериальными свойствами. Таким образом наночастицы металлов, полученные биологическим методом, или методом «зеленого» синтеза, из экстрактов таких растений, могут стать альтернативой существующим на данный момент многим современным антибактериальным препаратам. Антибактериальный механизм действия наночастиц зависит как от вида микроорганизмов, на которые оказывается воздействие, так и от типа наночастиц, их концентрации, размера, а также от способа их получения. В работе изучен антибактериальный эффект наночастиц серебра, меди и золота, полученных биологическим методом из солей металлов  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H[AuCl}_4]$  соответственно и экстракта растения — куркумы длинной (лат. *Curcuma longa*), — в отношении коллекционных штаммов следующих бактерий: *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *MRSA* (ATCC 38591) и полирезистентных клинических штаммов, выделенных от пациентов КГБУЗ ККБ (г. Красноярск) — *K. pneumoniae*, штамм 104, *P. aeruginosa*, штамм 40, *P. aeruginosa*, штамм 215, *A. baumannii*, штамм 210, *A. baumannii*, штамм 211. В ходе исследования определена минимальная подавляющая концентрация наночастиц методом серийных разведений (МУК 4.2.1890-04) с красителем азурином. Доказано, что наночастицы металлов проявляют разную антибактериальную эффективность в зависимости от вида используемых нанометаллов и культур бактерий. Наибольшей антибактериальной активностью обладают наночастицы меди, наименьшей — наночастицы золота. Наиболее выраженный антибактериальный эффект наблюдается в отношении клинических полирезистентных штаммов. Наночастицы металлов могут стать альтернативой известным на сегодняшний день антибактериальным препаратам, но несмотря на высокую эффективность наночастиц в отношении полирезистентных к антибактериальным препаратам микроорганизмов *in vitro*, следует учитывать их возможное токсическое действие, оказываемое на живые ткани, что требует дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo*.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, полирезистентность, антибактериальный эффект, наночастицы металлов, зеленый синтез, серебро, медь, золото.

## Адрес для переписки:

Гудкова Елизавета Сергеевна  
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1,  
ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.  
Тел.: 8 913 563-48-13 (моб.).  
E-mail: miss.gudcova@mail.ru

## Для цитирования:

Гудкова Е.С., Удегова Е.С., Гильдеева К.А., Рукосуева Т.В.,  
Съед Б. Антибактериальный эффект наночастиц металлов  
на антибиотикорезистентные штаммы бактерий // Инфекция  
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 771–776. doi: 10.15789/2220-7619-  
MNA-1359

© Гудкова Е.С. и соавт., 2021

## Contacts:

Elizaveta S. Gudkova  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1,  
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor  
V.F. Voino-Yasenetsky.  
Phone: +7 913 563-48-13 (mobile).  
E-mail: miss.gudcova@mail.ru

## Citation:

Gudkova E.S., Udegova E.S., Gildeeva K.A., Rukosueva T.V., Syed B. Metal  
nanoparticle antibacterial effect on antibiotic-resistant strains of bacteria //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet. 2021,  
vol. 11, no. 4, pp. 771–776. doi: 10.15789/2220-7619-MNA-1359

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-MNA-1359>

**METAL NANOPARTICLE ANTIBACTERIAL EFFECT ON ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF BACTERIA**

Gudkova E.S., Udegova E.S., Gildeeva K.A., Rukosueva T.V., Syed B.

*Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation*

**Abstract.** The rapid formation of microbial resistance to modern antibacterial drugs requires to search for new, alternative therapies. It is known that some organisms, such as plants, algae, fungi, are able to convert inorganic metal ions into metal nanoparticles due to the recovery process carried out by proteins, sugars and metabolites contained in the tissues and cells of these organisms. At the same time, many plants (e.g., plantain, yarrow, wormwood, turmeric long, calendula, marsh bagulnik, etc.) and metals (copper, silver, gold, zinc, etc.) themselves have antibacterial properties, so that metal nanoparticles obtained by biological method, or via "Green" synthesis method, from extracts of such plants can become a current alternative to many modern antibacterial drugs. The antibacterial mechanism of action of nanoparticles depends on the type of microorganisms affected, as well as on the type of nanoparticles, their concentration, size, and how they are obtained. Based on this, the study of the antibacterial effect of nanoparticles is one of the promising directions of solving the problem of microbial antibiotic resistance. There was examined antibacterial effect of metal nanoparticles containing silver, copper and gold obtained by biological method from the salts of  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H[AuCl}_4]$  metals, respectively, and the extract of the plant — turmeric long (lat. *Curcuma longa*) — related to the following bacteria strain collection: *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *MRSA* (ATCC 38591) and polyresistant clinical strains isolated from patients of the Regional clinical hospital (Krasnoyarsk) — *K. pneumoniae*, strain 104, *P. aeruginosa*, strain 40, *P. aeruginosa*, strain 215, *A. baumannii*, strain 210, *A. baumannii*, strain 211. Study allowed to identify the minimum suppressive concentration of nanoparticles by the method of serial dilutions (MUK 4.2.1890-04) with azurin dye. It was proved that metal nanoparticles exhibit different antibacterial efficacy depending on the type of nanometals used and bacterial cultures. Copper nanoparticles have the highest antibacterial activity, and gold nanoparticles have the lowest. The most marked antibacterial effect was observed against clinical polyresistant strains. Metal nanoparticles can become an alternative to the currently known antibacterial drugs, but despite the high efficiency of nanoparticles against polyresistant to antibacterial drugs microorganisms *in vitro*, it is necessary to take into account their possible toxic effect on live tissues, which requires further study in experiments *in vivo*.

**Key words:** antibiotic resistance, polyresistance, antibacterial effect, metal nanoparticles, green synthesis, silver, copper, gold.

**Введение**

Быстрое формирование устойчивости микроорганизмов к современным антибактериальным препаратам требует поиска все новых, альтернативных методов терапии [5, 9, 13], одним из которых может стать использование наночастиц металлов. Наночастицы экологически не опасны, обладают бактерицидной активностью [6, 10, 15], а также имеют низкую себестоимость, что играет немаловажную роль при решении вопроса их выбора.

Механизм действия наночастиц на микроорганизмы мало изучен. Известно, что они могут оказывать как бактериостатический, так и бактерицидный эффект, действовать как интрацеллюлярно, так и экстрацеллюлярно. Согласно некоторым теориям, наночастицы могут способствовать ингибированию ферментов дыхательной цепи, тем самым разобщая процессы окисления и окислительного фосфорилирования; взаимодействовать с нуклеотидами, нарушая стабильность ДНК; взаимодействовать с пептидогликанами клеточной стенки, блокируя способность передавать кислород; или выступать в роли катализатора, способствуя окислению протоплазмы растворенным в воде кислородом [6, 13]. Механизм действия зависит как от вида микроорганизмов, на который оказывается воздействие, так и от типа наночастиц, их концентрации, размера, а также от способа их получения.

Некоторые растения, водоросли, грибы, способны превращать ионы неорганических ме-

таллов в металлические наночастицы за счет процесса восстановления, осуществляемого биологически активными веществами, содержащимися в тканях и клетках этих организмов. «Зеленый» синтез — биологический метод получения металлических наночастиц различной морфологии из солей металлов с использованием в качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов экстракты растений [4, 10, 14, 15]. Выделенные экстракты содержат весь необходимый спектр веществ, необходимых для производства металлических наночастиц, а именно полисахариды, ферменты, аминокислоты, витамины, белки, органические кислоты, а также широкий комплекс вторичных метаболитов, например алкалоиды, флавоноиды, стероиды, дубильные вещества, сапонины и фенольные кислоты [10, 12]. Растительные экстракты могут выступать в роли восстанавливающих и стабилизирующих агентов, ингибируя возможную агрегацию и агломерацию синтезированных наночастиц с образованием на их поверхности продуктов взаимодействия [12]. Например, химическими модификаторами являются серосодержащие кислоты — метионин или цистеин, при действии которых гидрофильная карбоновая группа обеспечивает растворимость в воде, а сера связывается с поверхностью наночастицы. Таким образом, синтезируясь, наночастицы принимают наиболее энергетически выгодную конформацию за счет способности растительных экстрактов не только к восстановлению, но и к стабилизации.

Известно, что серебро восстанавливает из нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) люцерна посевная, азадирахта индийская, базилик душистый, ревень пальчатый, медь — из сульфата меди ( $\text{CuSO}_4$ ) ирис псевдоаировый, герань пахучая, лимонник, золото — из золотохлористоводородной кислоты ( $\text{H[AuCl}_4\text{]}$ ) люцерна посевная и т. п. [7, 10]. Поскольку многие растения (например, подорожник, тысячелистник, полынь, куркума длинная [3, 14], календула, багульник болотный и т. д.) и металлы (медь, серебро, золото, цинк и т. д.) сами по себе обладают антибактериальными свойствами [2, 8], наночастицы металлов, полученные биологическим методом из экстрактов таких растений, могут стать альтернативой существующим на данный момент многим современным антибактериальным препаратам.

Цель исследования — изучение антибактериального эффекта наночастиц металлов, полученных биологическим методом, в отношении антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

## Материалы и методы

Изучение биологической активности наночастиц в отношении бактерий проводилось с помощью метода серийных разведений (МУК 4.2.1890-04) с красителем азурином. Для культур бактерий определена минимальная подавляющая концентрация (МПК) наночастиц металлов — серебра, меди, золота, полученных биологическим методом из экстракта куркумы длинной (лат. *Curcuma longa*) и солей металлов:  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H[AuCl}_4\text{]}$  соответственно.

Для получения наночастиц металлов использовался метод химического осаждения. Полученные наночастицы — полидисперсные со средним размером от 20 до 50 нм [11]. В качестве восстановителя и стабилизатора использовался экстракт куркумы длинной, полученный в результате экстрагирования методом мацерации водно-спиртовым раствором с последующим разбавлением дистиллированной водой и центрифугированием в течение 10 мин на скорости 10 000 об/мин. Основные химические группы куркумы длинной, участвующие в восстановлении солей металлов за счет электростатического взаимодействия — карбонильные, гидроксильные, аминогруппы, метоксигруппы. Входящий в состав *Curcuma longa* куркумин (до 0,6%) известен своим противовоспалительными и антиоксидантным действием за счет ингибирования циклооксигеназы и задержки образования активных форм кислорода, а также ранозаживляющими, противомикробными свойствами [12, 14].

Используемые культуры бактерий — *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 38591) и полирезистентные клинические штаммы, выделенные от пациентов с тяжелыми гнойно-воспалительными процессами КГБУЗ

ККБ (г. Красноярск) — *Klebsiella pneumoniae* штамм 104, *Pseudomonas aeruginosa* штамм 40, *Pseudomonas aeruginosa* штамм 215, *Acinetobacter baumannii* штамм 210, *Acinetobacter baumannii* штамм 211 (табл.).

Взвесей наночастиц (меди, золота или серебра) в дистиллированной воде предварительно развели в лунках плоскодонного планшета с бульоном Мюллера–Хинтона: таким образом, максимальная концентрация наночастиц металлов составила 5 г/л, а минимальная концентрация — 0,0097 г/л. Затем в лунки были внесены суспензии тест-штаммов суточных культур (0,5 ед. по МакФарланду) с дальнейшим культивированием при температуре 37°C на протяжении 24 ч.

На следующие сутки в лунки был добавлен краситель азурин с дальнейшим культивированием культур при 37°C в течение двух часов. Критерием учета являлся цвет содержимого лунки, указывающий на наличие или отсутствие роста бактерий при эмпирическом сравнении с контрольными образцами роста культуры.

При добавлении азурина к среде с культурой бактерий он выступает в роли донора электронов для нитритредуктазы при экспрессии в азотфиксирующих организмах. При денитрификации или нитратном дыхании факультативных анаэробных бактерий происходит уменьшение окисленных форм азота в ответ на окисление донора электронов, такого как органическое вещество, в связи с чем цвет среды меняется при условии роста бактерий [1].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в IBM SPSS Statistics, для оценки нормальности распределения полученных данных использовался критерий Шапиро–Уилка, для оценки различий между количественными данными — критерий Манна–Уитни на уровне значимости 0,05,  $n = 72$  (каждый опыт проводился в трех повторностях).

## Результаты и обсуждение

В результате проведенного эксперимента определена минимальная подавляющая концентрация (МПК), а также доказана антибактериальная активность наночастиц металлов в отношении антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных штаммов бактерий (рис. 1). Эффективность действия наночастиц зависит не только от принадлежности бактерий к грамположительной или грамотрицательной группе (отсутствие различий на уровне значимости 0,05,  $n = 72$ ), иначе из-за различий в строении клеточной стенки бактерий ожидаемым результатом был бы более выраженный антибактериальный эффект, направленный на одну определенную группу микроорганизмов, чего в данном исследовании не наблюдалось. В связи с чем можно предположить, что механизм антибактериального эффекта наночастиц металлов не ограничивается воздействием лишь на клеточную стенку микроорганизмов.

**Таблица. Антибиотикограмма клинических штаммов, выделенных от пациентов КГБУЗ ККБ (г. Красноярск)**

Table. Antibiotogram of clinical strains isolated from patients of the Regional Clinical Hospital (Krasnoyarsk)

Бактерии Bacteria	<i>K. pneumoniae</i> , штамм 104 <i>K. pneumoniae</i> , strain 104	<i>P. aeruginosa</i> , штамм 40 <i>P. aeruginosa</i> , strain 40	<i>P. aeruginosa</i> , штамм 215 <i>P. aeruginosa</i> , strain 215	<i>A. baumannii</i> , штамм 210 <i>A. baumannii</i> , strain 210	<i>A. baumannii</i> , штамм 211 <i>A. baumannii</i> , strain 211
	Отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) № 1 Department of reanimation and intensive therapy No. 1 Диагноз: термический ожог III А   Diagnosis: thermal burn III A				
Антибиотик Antibiotic	Смыв с бронхов Flushing from the bronchi	Отделяемое дренажа Detachable drainage	Смыв с бронхов Flushing from the bronchi	Смыв с бронхов Flushing from the bronchi	Отделяемое дренажа Detachable drainage
Цефоперазон/Cefoperazone	–	R	S	R	R
Цефтазидим/Ceftazidime	R	R	S	R	R
Цефепим/Cefepime	R	R	S	R	R
Имипенем/Imipenem	S	S	S	R	S
Меропенем/Meropenem	R	R	R	R	R
Тикарциллин/Клавуланат Ticarcillin/Clavulanate	–	R	R	R	R
Гентамицин/Gentamycin	R	R	S	R	R
Тобрамицин/Tobramycin	–	R	S	S	S
Амикацин/Amikacin	R	R	S	R	R
Котримоксазол/Co-trimoxazole	–	R	R	R	R
Хлорамфеникол/Chloramphenicol	–	R	R	R	R
Ципрофлоксацин/Ciprofloxacin	S	R	R	R	R

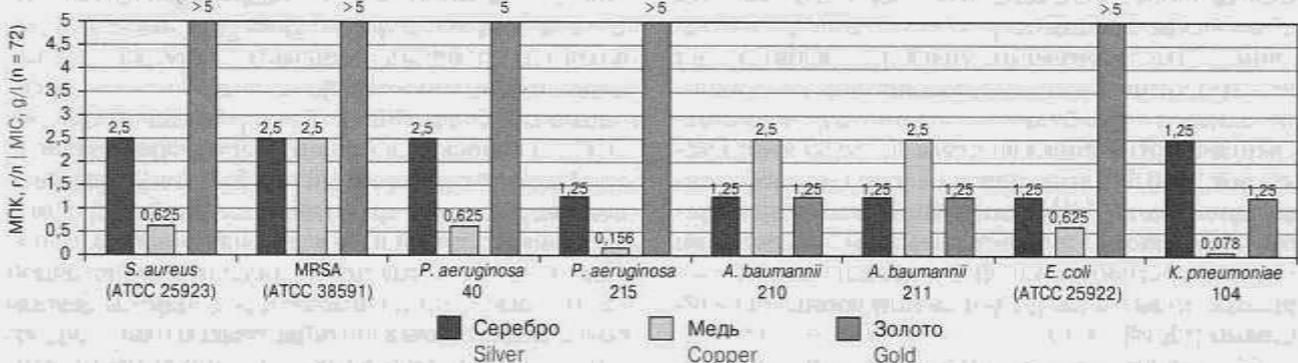
**Примечание.** R — антибиотикорезистентность штамма бактерий к антибактериальному препарату, S — антибиотикочувствительность штамма.  
Note. R— antibiotic resistance of the bacterial strain to the antibacterial drug, S — antibiotic sensitivity of the strain.

Антибактериальная активность достигается в результате использования наночастиц металлов в разных концентрациях (рис. 2)

Эффективность действия наночастиц металлов во многом зависит от принадлежности микроорганизмов к клиническим полирезистентным или антибиотикочувствительным музейным культурам — наночастицы меди, а также серебра и золота наиболее активны в отношении полирезистентных клинических штаммов бактерий (наличие различий на уровне значимости 0,05,  $p = 72$ ). Полученный результат подтверждают аналогичные исследования на других микроорганизмах,

авторы которых отмечают, что максимальный антибактериальный эффект наночастиц металлов достигается при воздействии на клинические штаммы бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [6, 10, 11, 13, 14].

Подтверждено и наличие различий во влиянии на антибактериальную активность используемых солей металлов. Как и предполагалось наночастицы серебра и меди оказали наибольшую подавляющую активность: минимальная МПК наночастиц меди составила 0,078 г/л (для *K. pneumoniae* 104), а максимальная МПК для остальных штаммов не превысила 2,5 г/л. Наночастицы серебра также



**Рисунок 1. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) наночастиц металлов в отношении антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных штаммов бактерий**

Figure 1. Minimum suppressive concentration (MPC) of metal nanoparticles against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant bacterial strains

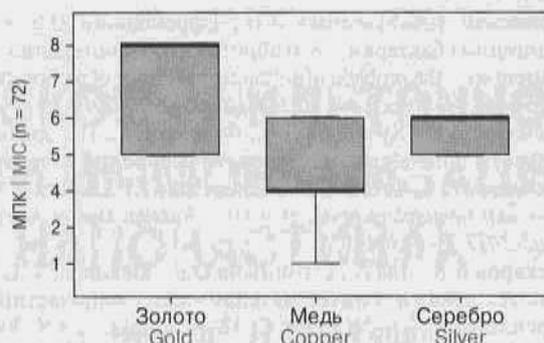
оказали видимый эффект, максимальная МПК, как и для наночастиц меди, не превысила 2,5 г/л, минимальная МПК составила 1,25 г/л (*P. aeruginosa* 215). По некоторым источникам, наночастицы серебра менее токсичны по сравнению с ионной формой, что расширяет спектр их применения в медицине, например, в составе перевязочного материала или покрытия поверхностей имплантатов, связанной с их способностью вызывать деградацию биопленок, сформированных полирезистентными штаммами [11].

Наименьшая антибактериальная эффективность была выявлена при использовании наночастиц золота: в отношении 50% экспериментальных культур МПК > 5 г/л (*S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), MRSA (ATCC 38591), *P. aeruginosa* штамм 215), а минимальная МПК при этом составила 1,25 г/л в отношении трех штаммов (*K. pneumoniae* штамм 104, *A. baumannii* штамм 210, *A. baumannii* штамм 211). Одним из предположений, объясняющих низкую антибактериальную эффективность наночастиц золота, может быть то, что золото по сравнению с другими используемыми металлами за счет своих элементных свойств наименее токсично [13].

Таким образом, наночастицы меди и серебра в отличие от наночастиц золота при использовании в низких концентрациях обладают выраженным антибактериальным действием.

## Заключение

Наночастицы серебра, меди и золота оказывают видимый антибактериальный эффект, однако чувствительность штаммов бактерий к разным нанометаллам не одинакова: среди используемых в эксперименте металлов наночастицы меди демонстрируют наиболее выраженные антибактериальные свойства. Несмотря на высокую эффективность наночастиц меди в отношении микроорганизмов *in vitro*, следует учитывать их возможное токсическое действие, оказываемое на живые ткани, что требует



	1	2	3	4	5	6	7	8
МПК, г/л	0,078	0,156	0,312	0,625	1,250	2,500	5,000	> 10,000
МИС, г/л								

**Рисунок 2. Сводная минимальная подавляющая концентрация (МПК) наночастиц металлов в отношении используемых в исследовании штаммов микроорганизмов**

Figure 2. A summary of the minimum overwhelming concentration (MPC) of metal nanoparticles against strains of microorganisms

дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo*. Антибактериальное действие наночастиц металлов в большей степени выражено в отношении клинических полирезистентных штаммов бактерий. Таким образом, наночастицы могут стать альтернативой известным на сегодняшний день антибактериальным препаратам.

## Благодарности

Выражаем признательность заведующей кафедрой микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Перьяновой Ольге Владимировне, консультировавшей авторов в процессе выполнения и написания работы, а также сотрудникам технического персонала кафедры Поткиной Надежде Константиновне и Школьной Вере Григорьевне за помощь в проведении исследований.

## Список литературы/References

1. Авдеенков П.П., Чистяков Н.Е. Механизм денитрификации // Наука, техника и образование. 2019. № 4 (57). С. 19–22. [Avdeenkov P.P., Chistyakov N.E. Denitrification mechanism. *Nauka, tekhnika i obrazovanie = Science, Technology and Education*, 2019, no. 4 (57), pp. 19–22. (In Russ.)]
2. Буданова Е.В., Горленко К.Л., Киселев Г.Ю. Вторичные метаболиты растений: механизмы антибактериального действия и перспективы применения в фармакологии // Антибиотики и химиотерапия. 2019. Т. 64, № 5–6. С. 69–76. [Budanova E.V., Gorlenko K.L., Kiselev G.Yu. Secondary plant metabolites: mechanisms of antibacterial action and perspectives of application in pharmacology. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2019, vol. 64, no. 5–6, pp. 69–76. (In Russ.)] doi: 10.24411/0235-2990-2019-100034
3. Гужова В.Ф., Чернова А.В., Казимирченко О.В. Исследование свойств соли, обогащенной фитоконпонентами лекарственных трав и специй // Вестник международной академии холода. 2017. № 4. С. 9–17. [Guzhova V.F., Chernova A.V., Kazimirenko O.V. The Properties of salt enriched by phytocomponents of medicinal herbs and spices. *Vestnik Mezhdunarodnoy akademii kholoda = Bulletin of the International Academy of Refrigeration*, 2017, no. 4, pp. 9–17. (In Russ.)] doi: 10.21047/1606-4313-2017-16-4-9-17
4. Дыкман Л.А., Шеголев С.Ю. Взаимодействие растений с наночастицами благородных металлов // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52, № 1. С. 13–24. [Dykman L.A., Shchyogolev S.Yu. Interactions of plants with noble metal nanoparticles (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*, 2017, vol. 52, no. 1, pp. 13–24. (In Russ.)] doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.13rus

5. Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2019. № 5. С. 64–68. [Efimenko T.A., Terekhova L.P., Efremenkova O.V. Current state the problem of antibiotic resistance of pathogens. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2019, no. 5, pp. 64–68. (In Russ.)] doi: 10.24411/0235-2990-2019-100033
6. Леонтьев В.К., Кузнецов Д.В., Фролов Г.А., Погорельский И.П., Латута Н.В., Карасенков Я.Н. Антибактериальные эффекты наночастиц металлов // Российский стоматологический журнал. 2017. Т. 21, № 6. С. 304–307. [Leont'ev V.K., Kuznetsov D.V., Frolov G.A., Pogorelskiy I.P., Latuta N.V., Krasenkov Ya.N. Antibacterial effects of nanoparticles of metals. *Rossiiskii stomatologicheskii zhurnal = Russian Dental Journal*, 2017, vol. 21, no. 6, pp. 304–307. (In Russ.)] doi: 10.18821/1728-2802-2017-21-6-304-307
7. Макаров В.В., Лав А., Синицына О.В., Макарова С.С., Яминский И.В., Тальянский М.Э., Калинина Н.О. «Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2014. Т. 6, № 1 (20). С. 37–47. [Makarov V.V., Lav A., Sinitsyna O.V., Makarova S.S., Yaminsky I.V., Talyansky M.E., Kalinina N.O. "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae (Russian version)*, 2014, vol. 6, no. 1 (20), pp. 37–47. (In Russ.)] doi: 10.32607/20758251-2014-6-1-35-44
8. Тапальский Д.В., Тапальский Ф.Д. Антибактериальные свойства растительных экстрактов и их комбинаций с антибиотиками в отношении экстремально-антибиотикорезистентных микроорганизмов // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2018. № 1. С. 78–83. [Tapalskiy D.V., Tapalskiy F.D. Antibacterial effects of herbal extracts and their combinations with antibiotics in relation to extensively antibiotic-resistant microorganisms. *Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik "Chelovek i ego zdorov'e" = Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*, 2018, no. 1, pp. 78–83. (In Russ.)] doi: 10.21626/vesnik/2018-1/12
9. Хохлова О.Е., Акушева Д.Н., Перьянова О.В., Корецкая Н.М., Абарникова О.В., Королькова Е.К., Белоусова Ю.Н., Саламатина О.В., Безручкина Т.Н., Князева К.М., Шогжал И.С., Поткина Н.К., Элярт В.Ф., Ямамото Т. Молекулярно-генетические особенности метициллинрезистентных *S. aureus*, выделенных от лиц пенитенциарной системы, инфицированных ВИЧ // Сибирское медицинское обозрение. 2018. № 2 (110). С. 13–18. [Khokhlova O.E., Akusheva D.N., Per'yanova O.V., Koretskaya N.M., Abarnikova O.V., Korol'kova E.K., Belousova Yu.N., Salamatina O.V., Bezruchkina T.N., Knyazeva K.M., Shogzhal I.S., Potkina N.K., Elyart V.F., Yamamoto T. Molecular-genetic features of methicillin-resistant *S. aureus*, have got from the persons of the penitentiary system, infected with HIV. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2018, no. 2 (110), pp. 13–18. (In Russ.)] doi: 10.20333/2500136-2018-2-13-18
10. Arokiyaraj S., Vincent S., Saravanan M., Lee Y., Oh Y.K., Kim K.H. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum palmatum* root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Artif. Cells, Nanomed. Biotechnol.*, 2017, vol. 45, no. 2, pp. 372–379. doi: 10.3109/21691401.2016.1160403
11. Baker S., Perianova O.V., Prudnikova S.V., Kuzmin A., Potkina N.K., Khokhlova O.Y., Lobova T.I. Phytogetic nanoparticles to combat multidrug resistant pathogens and photocatalytic degradation of dyes. *BioNanoScience*, 2020, no. 10, pp. 486–492. doi: 10.1007/s12668-020-00727-z
12. El-Seedi H.R., El-Shabasy R.M., Khalifa Sh.A.M., Saeed A., Shah A., Shah R., Iftikhar F.J., Abdel-Daim M.M., Omri A., Hajrahand N.H., Sabir J.S.M., Zou X., Halabi M.F., Sarhann W., Guo W. Metal nanoparticles fabricated by green chemistry using natural extracts: biosynthesis, mechanisms, and applications. *RSC Advances*, 2019, no. 9, pp. 24539–24559. doi: 10.1039/C9RA02225B
13. Hasani A., Madhi M., Gholizadeh P., Mojarrad J.S., Rezaee M.A., Zarrini G., Kafil H.S. Metal nanoparticles and consequences on multi-drug resistant bacteria: reviving their role. *SN Appl. Sci.* 2019, no. 1 (4). doi: 10.1007/s42452-019-0344-4
14. Jayarambabu N., Akshaykranth A., Venkatappa Rao T., Venkateswara Rao K., Rakesh Kumar R. Green synthesis of Cu nanoparticles using *Curcuma longa* extract and their application in antimicrobial activity. *Mater. Lett.*, 2019, vol. 259: 126813. doi: 10.1016/j.matlet.2019.126813
15. Nasrollahzadeh M., Sajjadi M., Dadashi J., Ghafuri H. Pd-based nanoparticles: plant-assisted biosynthesis, characterization, mechanism, stability, catalytic and antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2020, vol. 276: 102103. doi: 10.1016/j.cis.2020.102103

**Авторы:**

**Гудкова Е.С.**, студентка 5 курса специальности «Медицинская кибернетика», ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия;

**Удегова Е.С.**, студентка 5 курса специальности «Медицинская кибернетика», ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия;

**Гильдеева К.А.**, студентка 5 курса специальности «Медицинская кибернетика», ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия;

**Рукосуева Т.В.**, к.б.н., доцент кафедры микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича, ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия;

**Сyed Б.**, к.б.н., преподаватель кафедры микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича, ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, Россия.

**Authors:**

**Gudkova E.S.**, 5<sup>th</sup> year Student majoring in Medical Cybernetics, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Udegova E.S.**, 5<sup>th</sup> year Student majoring in Medical Cybernetics, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Gildeeva K.A.**, 5<sup>th</sup> year Student majoring in Medical Cybernetics, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Rukosueva T.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology named after Associate Professor B.M. Zelmanovich, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Syed B.**, PhD (Biology), Professor, Department of Microbiology named after Associate Professor B.M. Zelmanovich, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Отправлена на доработку 01.04.2020

Принята к печати 29.11.2020

Received 10.01.2020

Revision received 01.04.2020

Accepted 29.11.2020

# УСИЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ АНТИГЕНА НА МИКРО- И НАНОЧАСТИЦАХ

Р.Г. Сахабеев<sup>1</sup>, Д.С. Поляков<sup>1</sup>, А.Д. Гошина<sup>2</sup>, А.А. Вишня<sup>3</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>1</sup>,  
Е.С. Сеницына<sup>4,5</sup>, В.А. Коржиков-Влах<sup>4</sup>, Т.Б. Тенникова<sup>4</sup>, М.М. Шавловский<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Институт химии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> ФГБНУ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Данная работа является частью проекта по созданию «ловушек» вирусных частиц. Создание подобных «ловушек» осуществляется за счет ковалентной иммобилизации на поверхности нано- или микрочастиц на полимерной основе рекомбинантного рецептора, специфического для данного вируса. Предполагается, что полученные конъюгаты «белок–частица» будут способны к связыванию с вирионами для последующего поглощения их клетками иммунной системы организма. Целью работы являлось изучение влияния микро- и нано-частиц на основе полимолочной кислоты (ПМК), а также блок-сополимера ПМК и полиэтиленгликоля (ПМК-ПЭГ) на клеточный иммунный ответ в отношении антигена, связанного с данными полимерными частицами. **Материалы и методы.** Методом аффинной хроматографии был получен рекомбинантный химерный модельный белок бета-2-микроглобулин — зеленый флуоресцентный белок ( $\beta 2M$ -sfGFP). Рекомбинантный белок иммобилизовали на полимерных частицах, которые использовали для иммунизации мышей. В работе использовали самок мышей-гибридов F1 (CBA x C57BL) 4–6-месячного возраста массой в среднем 20–25 г. Опытные и контрольные группы включали по 15 животных. Для оценки клеточного иммунного ответа был использован метод внутриклеточного окрашивания цитокинов. **Результаты и обсуждение.** Показано, что наночастицы на основе сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля способны связывать 10 мкг белка на 1 мг полимера, а микрочастицы на основе полимолочной кислоты — 2,3 мкг белка на 1 мг полимера. Первая группа мышей была иммунизирована конъюгатом частиц на основе сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля диаметром 100 нм с модельным белком. Вторая — смесью этих же частиц с растворимым модельным белком. Третья группа была иммунизирована конъюгатом частиц на основе полимолочной кислоты диаметром 1400 нм с модельным белком. Четвертая — смесью этих же частиц с растворимым модельным белком. Селезенки забирали через 2 недели после четырехкратной внутрибрюшинной иммунизации. Сравнение иммунного ответа в группах было осуществлено при помощи непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с поправкой Тюнки. Было показано, что количество антиген-специфических Т-клеток фенотипа CD4<sup>+</sup> (Т-хелперов), вырабатываемых к модельному белку, значительно выше при иммунизации мышей конъюгатом частиц и  $\beta 2M$ -sfGFP, чем

## Адрес для переписки:

Сахабеев Родион Григорьевич  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 953 152-68-07. E-mail: helm505@mail.ru

## Contacts:

Rodion G. Sakhabeev  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academician  
Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 953 152-68-07. E-mail: helm505@mail.ru

## Для цитирования:

Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Гошина А.Д., Вишня А.А., Кудрявцев И.В.,  
Сеницына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М.  
Усиление специфического Т-клеточного иммунного ответа при  
иммобилизации антигена на микро- и наночастицах // Инфекция  
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 777–783. doi: 10.15789/2220-7619-  
ETS-1374

## Citation:

Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Goshina A.D., Vishnya A.A., Kudryavtsev I.V.,  
Sinityna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M.  
Enhancing the specific T cell immune response against micro- and  
nanoparticle immobilized antigen // Russian Journal of Infection and  
Immunity = Infektsiya i Immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 777–783.  
doi: 10.15789/2220-7619-ETS-1374

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-73-10045.

The study was funded by Russian Science Foundation Grant No. 19-73-10045.

© Сахабеев Р.Г. и соавт., 2021

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ETS-1374>

при иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц, которая проводилась в контрольных группах. Разница оказалась достоверной ( $p < 0,001$ ). При этом было установлено, что количество антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток к модельному белку  $\beta 2\text{M-sfGFP}$  во всех исследуемых группах не различалось.

**Ключевые слова:** микрочастицы из гомополимера полимолочной кислоты, наночастицы из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля, «ловушки» вирусов, зеленый флуоресцентный белок, клеточный иммунный ответ.

## ENHANCING THE SPECIFIC T CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST MICRO- AND NANOPARTICLE IMMOBILIZED ANTIGEN

Sakhabeev R.G.<sup>a</sup>, Polyakov D.S.<sup>a</sup>, Goshina A.D.<sup>b</sup>, Vishnya A.A.<sup>c</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>a</sup>, Sinitsyna E.S.<sup>d,e</sup>, Korzhikov-Vlakh V.A.<sup>d</sup>, Tennikova T.B.<sup>d</sup>, Shavlovsky M.M.<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>e</sup> Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>f</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The current study was a part of the project on generating viral particle traps occurring due to covalent immobilization on the interface of recombinant virus-specific polymer-based nano- and microparticles. It is assumed that protein-particle conjugates could be able to bind virions followed by engulfment by immune cells. The study was aimed to examine the effect of polylactic acid (PLA) and PLA block-copolymer with polyethylene glycol (PLA-PEG)-based micro- and nanoparticles on the cellular immune response against polymeric particle-bound antigen. *Materials and methods.* A recombinant chimeric protein beta-2-microglobulin – green fluorescent protein ( $\beta 2\text{M-sfGFP}$ ) was obtained by affine chromatography. The recombinant protein was immobilized onto the polymer particles, which were further used for mice immunization. Female F1 hybrid mice (CBA x C57BL) in experimental and control groups consisted of 4–6-month-old 15 animals (weighted 20–25 g). Intracellular cytokine staining was used to evaluate the cellular immune response. *Results and discussion.* It was shown that the nanoparticles of PLA block-copolymer with polyethylene glycol (PLA-PEG) were able to bind 10 microgram protein per 1 mg polymer. The polylactic acid nanoparticles were able to bind 2,3 microgram protein per 1 mg polymer. In experiment, mice in group 1 were immunized with 100 nm PLA-PEG particle- $\beta 2\text{M-sfGFP}$  conjugate, in group 2 – with same particles together with soluble  $\beta 2\text{M-sfGFP}$ . In group 3, mice were immunized with 1400 nm PLA particles- $\beta 2\text{M-sfGFP}$  conjugate, and in group 4 – with same particles together with soluble protein. The spleens isolated 2 weeks after the four-time intraperitoneal immunization. Comparison of immune response between groups was assessed by nonparametric Kruskal–Wallis criterion with Tukey correction. It was shown that the number of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells produced to model protein was significantly higher after immunization with particle- $\beta 2\text{M-sfGFP}$  conjugate, as compared to control groups, wherein immunization was performed with a mixture of protein and unmodified particles ( $p < 0.001$ ). It was found that the number of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells formed against  $\beta 2\text{M-sfGFP}$  did not differ between all groups examined.

**Key words:** PLA-based microparticles, PLA-PEG-based nanoparticles, virus “traps”, green fluorescent protein, T-cell immune response.

## Введение

Подавление гиперпродукции вирусных частиц в инфицированном организме является одним из направлений противовирусной терапии [8]. Известно, что многие вирусы внедряются в клетки хозяев посредством рецепторного механизма. Следовательно, блокирование рецепторного пути проникновения вирусных частиц в клетки может служить одним из подходов для уменьшения вирусемии, а значит, и для предотвращения распространения вируса в организме. Мы предлагали для этих целей синтез частиц из уже используемого в медицине материала – сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля (ПМК-ПЭГ) [1, 3]. Нано- и микрочастицы на основе ПМК или ПМК-ПЭГ находят применение в различных областях медицины и биологии, в частности в генной те-

рапии, для таргетной доставки лекарственных препаратов, в том числе в терапии онкологических заболеваний, при вакцинации [5].

Одним из важнейших преимуществ для клинического применения полимерных частиц при вакцинации является их способность к постепенному высвобождению антигена, что позволяет уменьшить число повторных инъекций [9]. Следует отметить, что частицы из ПМК или ПМК-ПЭГ эффективно фагоцитируются антиген-презентирующими клетками *in vitro* и *in vivo*, поэтому большое количество исследований было посвящено изучению их поглощения дендритными клетками и макрофагами [11]. Было показано, что многие антигены, инкапсулированные или адсорбированные на частицах, вызывают широкий и мощный гуморальный иммунный ответ [4]. Следует отметить, что основной задачей большинства вакцин является

формирование плазматических клеток и долгоживущих антиген-специфических В-клеток памяти, способных продуцировать специфические антитела. В то время как специфические антитела способны нейтрализовать внеклеточные патогены, специфический клеточный иммунный ответ также является важнейшим механизмом для контроля внутриклеточных патогенов после инфекции. Клеточный иммунный ответ может ограничивать распространение инфекционных агентов путем распознавания и уничтожения инфицированных или опухолевых клеток.

В данной работе мы исследовали влияние полимерных микро- и наночастиц на клеточный иммунный ответ в отношении связанных с ними модельных белков. Наиболее иммуногенно перспективный тип частиц предполагается использовать в дальнейшем для создания «вирусных наноловушек», которые будут блокировать различные вирусы, в частности вирус гепатита С. Для этого планируется модифицировать полимерную матрицу частиц белками — хозяйскими рецепторами (или их фрагментами), которые обеспечивают проникновение вирионов в эукариотические клетки. Предполагается, что продукты связывания вируса с полимерными частицами могут обеспечивать эффективный клеточный ответ в результате их поглощения антиген-презентирующими клетками (АПК) с последующим процессингом и представлением эффекторным клеткам иммунной системы.

С целью изучения влияния наночастиц на иммунный ответ в отношении связанных белковых молекул была исследована иммуногенность модельных систем на лабораторных животных. В качестве модельного иммуногенного белка был использован рекомбинантный химерный белок бета-2-микроглобулин — зеленый флуоресцентный белок ( $\beta 2M$ -sfGFP), а в качестве полимерного носителя — наночастицы из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля и микрочастицы из гомополимера полимолочной кислоты. В статье представлены результаты оценки иммунного ответа на внутрибрюшинное введение исходных нано- и микро частиц на основе алифатических сложных полиэфиров и частиц с иммобилизованным модельным белком.

## Материалы и методы

*Связывание белка  $\beta 2M$ -sfGFP с наночастицами на основе ПМК-ПЭГ и микрочастицами на основе ПМК.* Синтез, выделение и очистку рекомбинантного модельного слитого белка  $\beta 2$ -микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу [1, 2, 14]. Получение и связывание полимерных частиц

с белком осуществляли по методике, описанной ранее [3].

*Животные.* В работе использовали самок-гибридов F1 (СВА х С57BL) 4–6-месячного возраста массой в среднем 20–25 г. Мышей содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 часов с предоставлением корма и воды *ad libitum*. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ препараты мышам вводили внутрибрюшинно. Количество  $\beta 2M$ -sfGFP для одной иммунизации во всех опытах составляло 1 мкг на 1 мышь. Препараты вводили в объеме 0,4 мл на животное. Иммунизировали мышей 4 раза с интервалом по 2 недели. Вся работа выполнялась в соответствии с международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (заключение локального этического комитета, выписка из протокола № 3/19 от 25.04.2019).

*Изучение полученных сывороток и обработка данных.* Анализ содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках иммунизированных мышей осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу иммуноферментного анализа (ИФА) [1]. Лунки 96-луночного планшета (Greiner 655061) активировали глутаровым альдегидом в течение часа. Затем в лунки вносили по 100 мкл раствора sfGFP с концентрацией 5 мкг/мл. Спустя час вносили раствор обезжиренного молока с добавлением 0,5%-ного Tween 20. Далее в лунки планшета вносили сыворотки мышей в объеме 100 мкл/лунка. Через час вносили специфические антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab97023), Abcam, Англия). Спустя час вносили проявитель (5 мг ТМБ растворяли в 1 мл ацетонитрила) и измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Анализ данных проводили в программе RStudio 1.1.453.

*Выделение и криоконсервация спленоцитов мыши.* Клетки выделяли из селезенок спустя 2 недели после последней, четвертой иммунизации. Выделенные селезенки помещали в пробирки типа эппендорф в 1 мл стерильной питательной среды DMEM (41965-039, Gibco, США) с антибиотиком/антимикотиком (15240-062, Gibco, США). Предварительно разрезали селезенку ножницами на 3 части, гомогенизировали в этом же эппендорфе пестиком. Давали отстояться примерно 5 мин. Переносили клеточную суспензию в пробирку на 15 мл и отмывали 10 мл стерильного PBS в течение 10 мин (200g при 10°C). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 3 мл буфера для

лизиса эритроцитов и инкубировали 5 мин [12]. Для остановки лизиса в образцы добавляли по 10 мл PBS, после чего осаждали ядродержащие клетки центрифугированием и отмывали избытком стерильного PBS (10 мин при 200g, 4°C). Полученный осадок клеток ресуспендировали в 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (SH30071.02, HyClone, США), а затем на холоде при постоянном перемешивании добавляли 1 мл двукратной криосреды (эмбриональная телячья сыворотка с 20%-ным ДМСО). Помещали по 1 мл суспензии в 2 криопробирки и оставляли в пенопластовом штативе с крышкой при -70°C. На следующий день переносили пробирки в жидкий азот, где они хранились до проведения дальнейших исследований.

**Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов.** Клетки мышинных селезенок были охарактеризованы при помощи антител к CD3, меченных APC (клон 17A2, 100236, BioLegend, США), антител к CD4, меченных PE (клон GK1.5, 100408, BioLegend, США), антител к CD8a, меченных PC7 (клон 53-6.7, 100722, BioLegend, США), антител к IFN $\gamma$ , меченных FITC (клон XMG1.2, 505806, BioLegend, США). Для выявления специфических к sfGFP T-клеток использовали общепринятый метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN $\gamma$ ) [7]. Клетки ( $10^6$  в лунке) культивировали в круглодонных 96-луночных планшетах в 200 мкл полной культуральной среды, приготовленной на основе RPMI-1640 (R8758-100ML, Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, водного раствора Хепес (Biolot, 1.2.6.), антибиотиков/антимикотиков (15240-062, Gibco, США), 2-меркаптоэтанола (0482-0.1, Amresco, США), ронколейкина  $10^6$  Ед/мл (НПК «Биотех», Россия). Инкубацию клеток проводили в CO $_2$ -инкубаторе при 37°C в течение 12 ч с антигеном, за 5 ч до завершения эксперимента добавляли 1x раствор BD GolgiPlug (555028, BD Bioscience, США), блокирующие экскрецию цитокинов из клетки. Для определения спонтанной продукции IFN $\gamma$  вместо стимулятора к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640. При анализе эти данные (отрицательный контроль) вычитались из показателей, полученных для антиген-стимулированных клеток. Проточную цитометрию проводили на Beckman Coulter Navios.

## Результаты

В ходе работы был успешно выделен и очищен модельный белок  $\beta$ 2M-sfGFP. Была проведена активация поверхности частиц (генерирование на поверхности полимерных частиц карбоксильных групп и их активация), связывание белка с поверхностью частиц и очистка полученного конъюгата. В качестве основы для создания по-

лимерных частиц использовали ПМК и сополимер ПМК-ПЭГ. Частицы на основе ПМК имели диаметр 1400 нм, PdI 0,32, и были получены методом одинарной эмульсии. Связывающая способность  $\beta$ 2M-sfGFP к частицам составляла 2,3 мкг белка на 1 мг частиц. Частицы на основе ПМК-ПЭГ имели диаметр 105 нм PdI 0.11, были получены методом наноосаждения. Связывающая способность  $\beta$ 2M-sfGFP к частицам составляла 10 мкг белка на 1 мг частиц.

Для изучения влияния частиц на иммуногенность модельного белка были проиммунизированы 4 равные по численности группы мышей (по 15 мышей в каждой группе, всего 60). Первая группа «ПМК\_ПЭГ\_100\_контроль» была проиммунизирована смесью немодифицированных частиц диаметром 105 нм из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля и свободного  $\beta$ 2M-sfGFP, вторая группа «ПМК\_ПЭГ\_100» — конъюгатом этих же частиц с  $\beta$ 2M-sfGFP, таким образом, что количество вводимых частиц и  $\beta$ 2M-sfGFP было одинаковым. Аналогично третья группа «ПМК\_1400\_контроль» была проиммунизирована смесью частиц диаметром 1400 нм из полимолочной кислоты и  $\beta$ 2M-sfGFP, четвертая группа «ПМК\_1400» — конъюгатом частиц такого типа с  $\beta$ 2M-sfGFP.

Были проведены 4 последовательных иммунизации мышей с интервалами по 2 недели. Забор крови и селезенок осуществлялся через 13 дней после последней иммунизации.

Относительное содержание специфических к белку sfGFP IFN $\gamma^+$  лимфоцитов определяли для следующих субпопуляций клеток: CD4 $^+$  T-клетки (IFN $\gamma^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ ) и CD8 $^+$  T-клетки (IFN $\gamma^+$ CD3 $^+$ CD8 $^+$ ).

Для оценки клеточного ответа был использован метод проточной цитометрии. При помощи критерия Шапиро–Уилка было установлено, что в каждой группе распределение не было нормальным ( $p < 0,001$ ). Поэтому для попарного сравнения четырех групп использовали непараметрический статистический критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Тьюки. Результаты попарного сравнения приведены в таблице.

Было показано, что количество антиген-специфических T-клеток иммунологической памяти фенотипа CD4 $^+$  (T-хелперов) к модельному белку  $\beta$ 2M-sfGFP значимо ниже в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц (контрольные группы, а именно «ПМК\_ПЭГ\_100\_контроль» и «ПМК\_1400\_контроль»), чем в случае иммунизации конъюгатом частиц и  $\beta$ 2M-sfGFP (группы «ПМК\_ПЭГ\_100» и «ПМК\_1400»). Различия статистически достоверны ( $p < 0,001$ ) (рис. 1). Аналогичным образом было определено количество CD8 $^+$  T-клеток к модельному белку. Контрольные группы достоверно не отличались от опытных (рис. 2). Однако

Таблица. Результаты статистического анализа Т-лимфоцитов

Table. Statistical analysis of T lymphocyte counts

		Сравниваемые группы/Compared groups		Р-уровень значимости P-value
CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100		< 0,001
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100		0,977
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100		< 0,001
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control		< 0,001
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control		0,546
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_1400/PLA_1400		< 0,001
CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100		0,709
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100		0,444
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100		0,691
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control		0,058
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100		0,999
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_1400/PLA_1400		0,074

наблюдается тенденция к повышению числа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в случае иммунизации мышечной конъюгатом частиц с модельным белком.

## Обсуждение

Для эффективной элиминации некоторых вирусов (вируса герпеса, ВИЧ, вируса папилломы человека, вируса гепатита С) из организма носителя требуется индукция не только гуморального, но и цитотоксического иммунного ответа, который основан на активации антиген-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Именно поэтому для реализации данной задачи в качестве носителей вакцин и лекарств предлагается использовать полимерные нано-

и микрочастицы. Для эффективной активации иммунного ответа необходимым условием является поглощение антигена макрофагами или дендритными клетками с последующей его презентацией в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости.

В нашей работе было установлено, что при внутрибрюшинном введении конъюгат частиц с модельным белком вызывает более выраженный клеточный иммунный ответ по сравнению со смесью частиц с модельным белком (рис. 1). По-видимому, этот эффект связан с особенностями поглощения и презентации антигенов, сорбированных на микрочастицах. По данным литературы, оптимальный размер частиц, поглощаемых макрофагами, составляет 500–

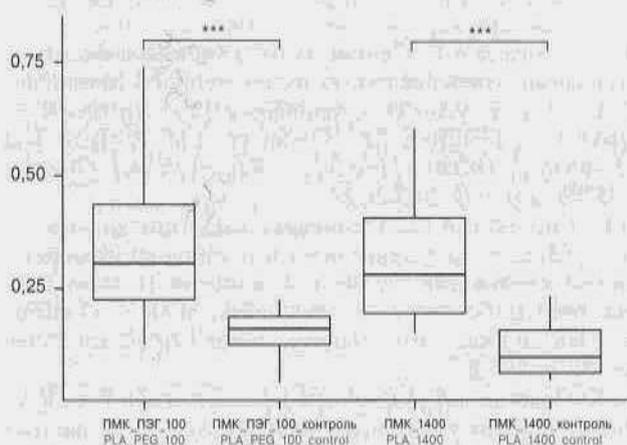


Рисунок 1. Относительное содержание антиген-специфических CD4<sup>+</sup> Т-клеток к модельному белку β2M-sfGFP у мышей (\*\*\*) —  $p < 0,001$

Figure 1. Relative number of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells specific to the model protein sfGFP in mice (\*\*\*) —  $p < 0.001$

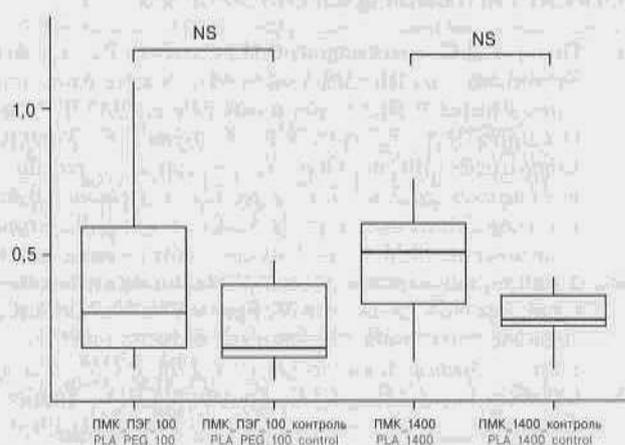


Рисунок 2. Относительное содержание антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток к модельному белку β2M-sfGFP у мышей ( $p > 0,05$ )

Figure 2. Relative number of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells to the model protein sfGFP in mice (NS — non-significant,  $p > 0.05$ )

5000 нм [6]. Дендритные клетки эффективно поглощают объекты в диапазоне 20–200 нм. Также было установлено, что частицы с размером до 200 нм проникают в клетки актин-независимым путем (например, клатрин-зависимым эндоцитозом) [15]. Более крупные частицы обычно поглощаются актин-зависимым образом в результате фагоцитоза. Эти особенности поглощения частиц, по-видимому, играют роль в иммунном ответе на антигены, связанные с данными частицами. Эти же особенности отличают иммунный ответ на антигены в составе частиц от ответа на введение обычных классических вакцин [10].

Проведенные нами исследования показали, что содержание  $CD4^+$  лимфоцитов, продуцирующих  $IFN\gamma$ , после внутрибрюшинного введения модифицированных белками частиц значительно выше, чем после введения несорбированных на частицах белковых антигенов. Размер частиц существенно не влияет на этот показатель. В то же время вне зависимости от состояния антигена (в составе частиц или в свободном состоянии) число  $CD8^+$  клеток после иммунизации не изменяется.

Следует подчеркнуть, что для эффективной активации  $CD4^+$  Т-клеток необходим сигнал от молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), которые экспрессируются на поверхности профессиональных антиген-презентирующих клеток (макрофагов, дендритных клеток и В-лимфоцитов). Таким образом, представленные эксперименты косвенно указывают на то, что частицы с иммобилизованным белком фагоцитируются макрофагами и далее фрагменты антигена представ-

ляются  $CD4^+$  Т-клеткам. Эти клетки участвуют также в стимуляции продукции цитокинов.  $CD8^+$  Т-клетки обладают свойствами цитолитических лимфоцитов и распознают антигены в ассоциации с МНС I, которые локализуются почти на всех клетках организма. Таким образом, частицы из полимолочной кислоты способствуют активации Т-хелперного иммунитета, что, совместно с гуморальным ответом, может существенно усиливать иммунный ответ на антигены, в том числе и вирусного происхождения, связанные с частицами.

В ходе предварительных исследований нами было установлено, что модифицированные модельным белком частицы вызывают менее выраженный гуморальный иммунный ответ по сравнению с несорбированным на частицах белком [1]. Более того, в литературе имеется ряд работ, которые доказывают эффективное использование полимерных частиц. Например, исследование, представленное в статье Saini V. и соавт. [13], было направлено на сравнение гуморального и клеточного иммунного ответов между рекомбинантным антигеном вируса гепатита В HBsAg, который был адсорбирован на микрочастицах из ПМК (однократное введение), и квасцовой вакциной с аналогичным антигеном HBsAg (две дозы). Были изучены специфический гуморальный и клеточный иммунные ответы на мышинной модели *in vivo*. На основании полученных авторами результатов был сделан вывод о том, что однократная инъекция полимерных микрочастиц вызвала лучший иммунный ответ (как гуморальный, так и клеточный) при сравнении с двумя инъекциями стандартной квасцовой вакцины против HBsAg.

## Список литературы/References

1. Поляков Д.С., Антимонова О.И., Сахабеев Р.Г., Грудинина Н.А., Ходова А.Е., Синицына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. Влияние наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка // *Инфекция и иммунитет*. 2017. Т. 7, № 2. С. 123–129. [Polyakov D.S., Antimonova O.I., Sakhabeev R.G., Grudinina N.A., Khodova A.E., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M. Polylactic acid nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 123–129. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-123-129]
2. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Бета-2-микроглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета-2-микроглобулинов человека // *Медицинский академический журнал*. 2010. Т. 10, № 2. С. 40–49. [Polyakov D.S., Grudinina N.A., Solovyov K.V., Egorov V.V., Sirotkin A.K., Aleinikova T.D., Totolian Areg A., Shavlovsky M.M. Beta2-microglobuline amyloidosis: fibrillogenesis of natural and recombinant human beta2-microglobulines. *Meditinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academical Journal*, 2010, vol. 10, no. 2, pp. 40–49. (In Russ.)]
3. Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Вишня А.А., Козловская А.А., Синицына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. Гуморальный иммунный ответ на антиген, иммобилизованный на наночастицах из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля // *Молекулярная медицина*. 2019. Т. 17, № 3. С. 32–36. [Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Grudinina N.A., Vishnja A.A., Kozlovskaja A.A., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M. The humoral immune response to the antigen immobilized on nanoparticles of copolymer of polylactic acid and polyethylene glycol. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2019, vol. 17, no. 3, pp. 32–36. (In Russ.) doi: 10.29296/24999490-2019-03-06]
4. Ataman-Önal Y., Munier S., Ganée A., Terrat C., Durand P.Y., Battail N., Verrier B. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release*, 2006, vol. 112, no. 2, pp. 175–185. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.02.006

5. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 161–171. doi: 10.1038/nrc1566
6. Gamvrellis A., Leong D., Hanley J.C., Xiang S.D., Mottram P., Plebanski M. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2004, vol. 82, no. 5, pp. 506–516. doi: 10.1111/j.0818-9641.2004.01271.x
7. He X.-S., Holmes T.H., Zhang C., Mahmood K., Kemble G.W., Lewis D.B., Arvin A.M. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 23, pp. 11756–11766. doi: 10.1128/jvi.01460-06
8. Martin-Subero M., Diez-Quevedo C. Mental disorders in HIV/HCV coinfecting patients under antiviral treatment for hepatitis C. *Psychiatry Res.*, 2016, vol. 246, pp. 173–181. doi: 10.1016/j.psychres.2016.09.041
9. Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Del. Rev.*, 2003, vol. 55, no. 3, pp. 329–347. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00228-4
10. Park Y.-M., Lee S.J., Kim Y.S., Lee M.H., Cha G.S., Jung I.D., Han H.D. Nanoparticle-based vaccine delivery for cancer immunotherapy. *Immune Network*, 2013, vol. 13, no. 5: 177. doi: 10.4110/in.2013.13.5.177
11. Peres C., Matos A.L., Connot J., Sainz V., Zupančič E., Silva J.M., Florindo H.F. Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. *Acta Biomaterialia*, 2017, vol. 48, pp. 41–57. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.012
12. Petukhova G., Naikhin A., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 19, pp. 2580–2587. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.035
13. Saini V., Jain V., Sudheesh M.S., Dixit S., Gaur R.L., Sahoo M.K., Kohli D. Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres. *J. Drug Target.*, 2010, vol. 18, no. 3, pp. 212–222. doi: 10.3109/10611860903386920
14. Solovyov K.V., Polyakov D.S., Grudinina N.A., Egorov V.V., Morozova I.V., Aleynikova T.D., Shavlovsky M.M. Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins trf-sfgfp and  $\beta$ 2M-sfGFP. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2011, vol. 41, no. 4, pp. 337–349. doi: 10.1080/10826068.2010.548433
15. Wang Z., Tirupathi C., Minshall R.D., Malik A.B. Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, no. 12, pp. 4110–4116. doi: 10.1021/nn9012274

**Авторы:**

**Сахабеев Р.Г.**, младший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Поляков Д.С.**, к.м.н., научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Гошина А.Д.**, студентка 4-го курса ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Вишня А.А.**, студентка 2-го курса магистратуры Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия;

**Кудрявцев И.В.**, к.б.н., зав. лабораторией иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Синицына Е.С.**, к.х.н., старший научный сотрудник межфакультетской лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ФГБНУ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Коржиков-Влах В.А.**, к.х.н., доцент межфакультетской лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Тенникова Т.Б.**, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник и руководитель межфакультетской лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Шавловский М.М.**, д.м.н., зав. лабораторией молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Sakhabeev R.G.**, Junior Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Polyakov D.S.**, PhD (Medicine), Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Goshina A.D.**, 4th-year Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vishnya A.A.**, 2th-year Master Student, Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunoregulation, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Sinitsyna E.S.**, PhD (Chemistry), Senior Researcher, Interdisciplinary Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Researcher, Laboratory of Polymer Sorbents and Carriers for Biotechnology, Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;**

**Korzhikov-Vlakh V.A.**, PhD (Chemistry), Associate Professor, Interdisciplinary Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Tennikova T.B.**, PhD, MD (Chemistry), Professor, Leading Researcher and Head of the Interdisciplinary Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Shavlovsky M.M.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Molecular Genetics Laboratory, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.02.2020  
Отправлена на доработку 25.03.2020  
Принята к печати 14.09.2020

Received 03.02.2020  
Revision received 25.03.2020  
Accepted 14.09.2020

# КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ РАЗВИТИЯ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ, АССОЦИИРОВАННОГО С ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ, У МОЛОДОГО ПАЦИЕНТА

О.В. Воробьева<sup>1</sup>, А.В. Ласточкин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия

<sup>2</sup> БУ Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы Минздрава Чувашии, г. Чебоксары, Россия

**Резюме.** Значимость проблемы хронических гепатитов определяется не только самой болезнью, но и увеличением риска формирования отдаленных неблагоприятных последствий — цирроза печени. Вирусные циррозы печени (в исходе хронических гепатитов В, С, В+D) составляют от 10 до 24,5% всех циррозов печени. Цирроз печени рассматривается как необратимая стадия хронического гепатита, чаще наблюдается у мужчин после 40 лет, однако в последние годы все больше случаев данного заболевания встречается у молодых, трудоспособных лиц, что приводит к инвалидизации. В связи с высоким потенциалом регенерационной способности печени прогноз при поражениях разной этиологии может быть достаточно благоприятным. В связи с этим необходима ранняя диагностика, динамический контроль и использование перспективных способов лечения патологии печени путем стимуляции ее регенерации, при которой возникает компенсация потерянных функций за счет регенерирующей ткани. В клинико-морфологическом случае описываются патоморфологические изменения в органах при циррозе печени, развившемся на фоне вирусного гепатита. Целью исследования было описание патоморфологических изменений в органах при циррозе печени, развившемся на фоне вирусного гепатита, что привело к полиорганной недостаточности у молодого пациента. *Материал и методы.* Проведен анализ полученной сопроводительной медицинской документации (амбулаторная карта пациента, история болезни). Применена стандартная методика патологоанатомического вскрытия. Для обработки гистологических срезов аутопсийного материала использовали окраску гематоксилин-эозином. *Результаты.* При гистологическом исследовании в печени отмечено развитие фиброза портальных трактов с лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией, формированием монобулярных узлов-регенератов, в легких и головном мозге выявлены признаки отека, обнаружены участки демиелинизации, дистрофические изменения в нейронах, в почках — признаки острой почечной недостаточности; комплекс тяжелых изменений привел к полиорганной недостаточности и летальному исходу у молодого пациента. Раннее формирование при циррозе печени портальной гипертензии, варикозного расширения вен пищевода и желудка приводит к фатальным кровотечениям у половины больных, поэтому проблема своевременной диагностики циррозов и гепатитов как их предшественников является одной из самых актуальных в медицине.

**Ключевые слова:** цирроз, печень, вирусный гепатит, отек, некронефроз, морфология.

## Адрес для переписки:

Воробьева Ольга Васильевна  
428015, Россия, г. Чебоксары, Московский пр., 15,  
ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет  
им. И.Н. Ульянова.  
Тел.: 8 927 858-05-18 (моб.).  
E-mail: olavorobeva@mail.ru

## Contacts:

Olga V. Vorobeva  
428015, Russian Federation, Cheboksary, Moskovskii pr., 15,  
I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
Phone: +7 927 858-05-18 (mobile).  
E-mail: olavorobeva@mail.ru

## Для цитирования:

Воробьева О.В., Ласточкин А.В. Клинико-морфологический случай развития цирроза печени, ассоциированного с вирусным гепатитом, у молодого пациента // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 784–788. doi: 10.15789/2220-7619-CAM-1330

## Citation:

Vorobeva O.V., Lastochkin A.V. Clinical and morphological case of developing liver cirrhosis associated with viral hepatitis in a young patient // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 784–788. doi: 10.15789/2220-7619-CAM-1330

## CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CASE OF DEVELOPING LIVER CIRRHOSIS ASSOCIATED WITH VIRAL HEPATITIS IN A YOUNG PATIENT

Vorobeva O.V.<sup>a</sup>, Lastochkin A.V.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> I.N. Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

<sup>b</sup> Republican Bureau of Forensic Medical Examination of the Ministry of Health of Chuvashia, Cheboksary, Russian Federation

**Abstract.** The significance of chronic hepatitis is determined not only by the disease per se, but also by the increased risk of the formation of long-term adverse effects such as liver cirrhosis. Viral cirrhosis of the liver (as the outcome of chronic hepatitis B, C, B + D) comprise from 10% to 24.5% of all liver cirrhosis cases. Cirrhosis of the liver is considered as an irreversible stage of chronic hepatitis, more often observed in men above 40 years, but recently more and more its cases are found in young, working ones leading to disability. Due to the high liver regenerative potential, a prognosis for liver lesions of different etiologies may be rather favorable. As a result, early diagnostics, dynamic monitoring and the use of promising methods for treating liver pathology to stimulate its regeneration that compensates for lost liver functions are necessary. In the clinical and morphological case, pathomorphological changes in organs with liver cirrhosis, which developed as a result of viral hepatitis are described. The aim of the study was to describe pathomorphological changes in organs during liver cirrhosis, which developed due to viral hepatitis, which led to multiple organ failure in a young patient. *Materials and methods.* The analysis of the obtained accompanying medical documentation (outpatient card, medical history) was performed. The standard methodology of autopsy was used. To process histological sections of autopsy material, hematoxylin-eosin staining was used. *Results.* Histological examination in the liver shows development of portal tract fibrosis with lymphohistiocytic infiltration, formation of monolobular regenerated nodes, signs of edema, areas of demyelination, dystrophic changes in neurocytes, signs of acute renal failure, a combined profound change in the kidneys detected in the lungs and brain, which resulted in multiple organ failure and subsequent lethal outcome in a young patient. The early formation of portal hypertension with liver cirrhosis, esophageal and gastric varicose veins dilatation lead to fatal bleeding in half of patients. Therefore, timely diagnosed cirrhosis and hepatitis as their predecessors is one of the most relevant issues in medicine.

**Key words:** cirrhosis, liver, viral hepatitis, edema, necronephrosis, morphology.

Вирусные гепатиты являются одной из значимых проблем современной медицины. Развитие хронического гепатита, как считают эксперты, характеризуется разной степенью фиброза печени [3]. Рекомендуют различать портальный, перипортальный и перигепатоцеллюлярный фиброз. При перипортальном фиброзе формируются порто-центральные или порто-портальные септы, при этом первые по сравнению со вторыми являются более важными в развитии цирроза печени — финальной стадии хронического течения. Значимость проблемы хронических гепатитов определяется не только самой болезнью, но и увеличением риска формирования отдаленных неблагоприятных последствий — цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы. Вирусные циррозы печени (в исходе хронических гепатитов В, С, В+D) составляют от 10 до 24,5% всех ЦП [4]. Цирроз печени рассматривается как необратимая стадия хронического гепатита, чаще наблюдается у мужчин после 40 лет, однако в последние годы все больше случаев данного заболевания встречается у молодых, трудоспособных лиц, что приводит к инвалидизации. В экономически развитых странах цирроз печени входит в число 8 основных причин смерти пациентов в возрасте 40–60 лет и составляет от 14 до 30 случаев на 100 000 человек. В мире от цирроза печени вирусной этиологии и гепатоцеллюлярной карциномы ежегодно умирают 40 млн человек. Длительность жизни свыше

5 лет с момента установления диагноза отмечается у 60% больных алкогольным и у 30% больных вирусным циррозом печени. Среди факторов, способствующих формированию цирроза печени, имеются указания на роль генотипа возбудителя. Так, для хронического вирусного гепатита установлено, что развитие цирроза печени ассоциировано с HLA-антигенами A1, B8 и гаплотипами A10, B8, Cw8, B8, DR3; A1, B8, Cw2, DR5; A3, B8, Cw3, DR2 [3,5]. Также фактором, способствующим фиброгенезу, считается длительность течения заболевания (персистенция вируса). Так, Schuppan D. (2003) [10] показал, что среди 225 больных хроническим гепатитом умеренной активности, не получавших специфического лечения, у 63 (28%) происходило нарастание фиброзирования на 1 и более баллов по шкале Knodell в течение 28 месяцев.

Осложнения цирроза печени, такие как асцит, варикозное расширение вен пищевода и желудка с последующим развитием кровотечения из них, печеночная энцефалопатия, гепатоцеллюлярная карцинома, гепаторенальный синдром, гиперспленизм и спонтанный бактериальный перитонит, возникают вследствие развития синдрома портальной гипертензии и гепатоцеллюлярной недостаточности. При развитии асцита лишь четвертая часть больных переживает 3 года [2, 3].

Как известно, гепатоцит — это долгоживущая полиплоидная клетка, способная к неограниченной пролиферации, что является основой

регенерации печени [1, 11]. При невозможности восстановления органа этим путем активируются дополнительные источники регенерации печени — овалы клетки каналов Геринга и клетки стволового резерва костного мозга, мигрирующие в печень [5, 6]. В связи с высоким потенциалом регенерационной способности печени прогноз при поражениях разной этиологии может быть достаточно благоприятным. В связи с этим необходима ранняя диагностика, динамический контроль и использование перспективных способов лечения патологии печени путем стимуляции ее регенерации, при которой возникает компенсация потерянных функций за счет регенерирующей ткани [3, 5].

Целью исследования было описание патоморфологических изменений в органах при циррозе печени, развившемся на фоне вирусного гепатита, что привело к полиорганной недостаточности у молодого пациента.

## Материалы и методы

Проведен анализ полученной сопроводительной медицинской документации (амбулаторная карта пациента, история болезни). Применена стандартная методика патологоанатомического вскрытия. Для обработки гистологических срезов аутопсийного материала использовали окраску гематоксилин-эозином.

## Результаты

Больной Г.Б., 26 лет, обратился за медицинской помощью к участковому терапевту в связи с жалобами на выраженную слабость, повышенную утомляемость, увеличение объема живота, желтушное окрашивание кожи и склер, боли в эпигастрии и в правом подреберье. Ухудшение самочувствия отмечал в течение двух недель, когда появились вышеописанные симптомы. Госпитализирован в приемно-диагностическое отделение с подозрением на острую хирургическую патологию. В ходе клинико-лабораторного обследования выявлены признаки портальной гипертензии. Для дальнейшего обследования и лечения был переведен в гастроэнтерологическое отделение. Из анамнеза известно, что пациент состоял на диспансерном учете по поводу хронического гепатита с 2017 г.

Из данных объективного осмотра при поступлении в стационар обращало на себя внимание тяжелое состояние пациента, выраженные изменения со стороны кожных покровов в виде многочисленных «сосудистых звездочек» и пальмарной эритемы в области груди, что могло быть проявлением геморрагического синдрома на фоне печеночно-клеточной недостаточности, признаки асцита, полнокровие сосудов

передне-боковой брюшной стенки по типу «головы медузы», признаки гепатоспленомегалии (печень на 6 см выступала из-под края реберной дуги, плотной консистенции, в левом подреберье пальпировалась увеличенная селезенка).

При анализе лабораторно-инструментальных данных отмечались признаки печеночно-клеточной недостаточности: гипербилирубинемия, гипоальбуминемия, гипопротромбинемия (мочевина: 21,6 ммоль/л, билирубин общий — 149,8 мкмоль/л, билирубин прямой — 35,3 мкмоль/л, АСТ — 73,0 ед/л), положительный анализ крови на маркеры вирусных гепатитов (anti-HBV). Резус-фенотипирование: С+с+Е–е+Kell–k+Cw–.

Данные обзорной рентгенографии грудной клетки: легочные поля без очаговых, инфильтративных теней. Легочный рисунок усилен в прикорневых, нижнемедиальных зонах.

При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости определялись признаки асцита, увеличения и диффузных изменений печени, перегиба желчного пузыря, спленомегалии.

В динамике в общем анализе крови нарастал лейкоцитоз (лейкоциты —  $20,53 \times 10^9/\text{л}$ ), была отмечена эритроцитопения (эритроциты —  $3,10 \times 10^{12}/\text{л}$ ), гемоглобин — 103 г/л, гематокрит — 29,2%, средний объем эритроцита 94,2 фл, среднее содержание гемоглобина 33,2 пг, средняя концентрация гемоглобина в эритроците 353 г/л, коэффициент распределения эритроцитов по размеру — 19,7%, тромбоцитопения (тромбоциты —  $146 \times 10^9/\text{л}$ , средний объем тромбоцита — 7,1 фл), тромбоцит — 0,15%, нейтрофилез (нейтрофилы —  $19,30 \times 10^9/\text{л}$ , относительное содержание нейтрофилов 94,0%), лимфоцитопения (лимфоциты —  $0,82 \times 10^9/\text{л}$ , относительное содержание лимфоцитов 4,0%), СОЭ — 25,0 мм/ч.

При динамическом наблюдении биохимического анализа крови выявлялось нарастание показателей: мочевина — 11,1 ммоль/л, креатинин — 148,0 мкмоль/л, билирубин общий — 170,2 мкмоль/л, билирубин прямой — 39,6 мкмоль/л, АСТ — 92,4 Ед/л, АЛТ — 68,0 Ед/л.

По данным ФГДС определялись морфологические признаки портальной гипертензии (варикозное расширение вен нижней трети пищевода, очаги геморрагий и эрозий слизистой оболочки пищевода, желудка).

Несмотря на проведенное лечение в соответствии со стандартами, состояние больного резко ухудшалось, нарастали явления отека головного мозга и легких с остановкой сердечной деятельности. Реанимационные мероприятия были прекращены по причине неэффективности принятых мер, констатирована биологическая смерть. Был выставлен посмертный клинический диагноз. Основное заболевание: цирроз пече-

ни смешанной этиологии (экзогенно-токсический + HBV-вирусной), класс С по Чайлду–Пью; портальная гипертензия; расширение селезеночной вены; асцит. Осложнения основного заболевания: печеночно-клеточная недостаточность тяжелой формы; гипербилирубинемия; гипоальбуминемия; гипопротромбинемия; спленомегалия с гиперспленизмом; печеночная энцефалопатия. Сопутствующее заболевание: хронический гастрит.

При секционном исследовании обнаружены признаки, характерные для мелкоузловой монолобулярного цирроза печени, при макроскопическом исследовании — печень размерами  $24 \times 15 \times 14 \times 11 \times 4$  см, с бугристым нижним краем, расположенная на уровне края реберной дуги. Вещество печени плотное, на разрезах желтое с выраженными узлами диаметром 0,1–0,3 см. При гистологическом исследовании отмечено нарушение гистоархитектоники печеночных долек, с развитием фиброза портальных трактов с лимфогистиоцитарной инфильтрацией, с формированием монолобулярных узлов-регенератов (ложных долек) (рис. 1А, Б, вклейка, с. III), в цитоплазме гепатоцитов выявлены зернистые и вакуольные включения. В просвете желудка до 980 г темно-красных свертков крови, складки слизистой хорошо выражены, слизистая бледно-розовая с очагами эрозий. Петли кишечника раздуты газами, в просвете кишечника темно-красного цвета кишечное содержимое. Селезенка размерами  $14 \times 9 \times 7$  см, массой 315 г, на разрезе определяется малокровная пульпа.

Со стороны других внутренних органов: вены пищевода и кардиальной части желудка расширены (рис. 2, вклейка, с. III), в брюшной полости до 5000 мл прозрачной желтой жидкости, в легких и головном мозге определялись признаки отека (рис. 3, 4, вклейка, с. III).

В сердце при гистологическом исследовании выявлены неравномерно гипертрофированные кардиомиоциты, между ними и периваскулярно наблюдалось сетчатое разрастание фиброзной ткани, участки фрагментации кардиомиоцитов (рис. 5, вклейка, с. IV).

В почках наблюдались явления острой почечной недостаточности, эпителий канальцев отечный, с разрушением апикальных поверхностей и ядер, с малокровными сосудами (рис. 6, вклейка, с. IV).

На основании результатов секционного исследования выставлен патологоанатомический диагноз. Основное заболевание: мелкоузловой монолобулярный цирроз печени, активная фаза, класс С по Чайлду–Пью; портальная гипертензия: варикозное расширение вен нижней трети пищевода и кардиального отдела желудка, спленомегалия (масса селезенки 315 г), асцит (5000 мл). Осложнения основного заболевания: кровоте-

чение из варикозно расширенных вен нижней трети пищевода: кровь в просвете желудка (980 г), кровь в просвете тонкого и толстого отделов кишечника; постгеморрагическое малокровие; отек легких; отек головного мозга. Сопутствующие заболевания: хронический гастрит.

Как известно, при хроническом вирусном гепатите наблюдается низкий уровень апоптоза гепатоцитов. Повреждение печени вызывается иммунным ответом хозяина на вирусные белки, экспрессирующие гепатоциты, поскольку вирус не является цитопатическим. Fas в сыворотке и печеночная экспрессия TNFR1, TNF $\alpha$  и Fas усиливаются при хронической вирусной инфекции и коррелируют с гистологической активностью; у пациентов с молниеносной печеночной недостаточностью, вызванной ВГВ, Fas-экспрессирующие лимфоциты были обнаружены в областях апоптотических гепатоцитов. Экспрессия TRAIL NK-клеток возрастает во временной корреляции с уровнями аланинаминотрансферазы в сыворотке крови во время вспышек, и обнаружено, что TRAIL-рецептор 2 активируется в образцах печени от пациентов с хроническим вирусным гепатитом [3, 6].

Таким образом, представленный случай демонстрирует агрессивное развитие трансформации печени в цирроз на фоне вирусного гепатита у молодого пациента. Раннее формирование при циррозе печени портальной гипертензии, варикозного расширения вен пищевода и желудка приводит к фатальным кровотечениям у половины больных, поэтому проблема своевременной диагностики циррозов и гепатитов как их предшественников является одной из самых актуальных в медицине. Латентное течение гепатитов и цирроза, отсутствие специфических жалоб на ранних этапах развития заболевания часто служит причиной поздней диагностики этих патологических состояний и приводит к формированию необратимой перестройки структуры печени [4]. В Глобальном докладе ВОЗ о гепатите 2018 г. (WHO Global Hepatitis Report, 2018) отмечается, что подавляющее большинство больных не имеют доступа к необходимому для спасения жизни тестированию и лечению. В результате миллионы людей находятся под угрозой медленного развития хронической болезни печени, рака и смерти. Для постановки правильного диагноза и определения дальнейшей тактики ведения пациента необходим комплексный анализ клинических, лабораторных исследований и данных, полученных методами медицинской визуализации [6]. Очень важно и крайне необходимо обсуждать вопросы ранней диагностики, динамического наблюдения и исключения расхождений в ведении и лечении таких сложных пациентов. Своевременное использование диагностических исследований,

в том числе комплексной эхографии у больных с циррозом печени с определением скорости, объема кровотока в сосудах воротной системы и портокавальных анастомозах, позволит определить оптимальные дифференциально-диагностические критерии для ранней диагностики портальной гипертензии. Кроме того, необходимо мультидисциплинарный подход к лечению патологии печени с применением современных способов стимуляции регенерации печени, среди которых можно назвать диатермокоагуляцию

поверхности печени, введение стволовых клеток в печеночную артерию и в ткань печени, введение в печеночную ткань аллопланта, пункционное чрескожное введение в печеночную ткань стимулятора регенерации — криопреципитата и т. д. [1, 2, 3, 5, 6]. На прогноз заболевания, а значит и на качество жизни, влияют ранняя диагностика, дифференциальный подход, коррекция лечения. Выполнение этих условий позволит избежать серьезных осложнений, опасных для жизни пациента.

## Список литературы/References

1. Карев В.Е., Лобзин Ю.В., Цинзерлинг В.А. Сравнительная характеристика клинического течения, повреждения и регенерации печени при хронической HBV- и HCV-инфекции // Журнал инфектологии. 2013. Т. 1, № 5. С. 91–98. [Karev V.E., Lobzin Yu.V., Cinslerling V.A. The comparative description of clinical course, injury and regeneration of liver while chronic HBV- and HCV-infections course. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2013, vol. 1, no. 5, pp. 91–98. (In Russ.)] doi: 10.22625/2072-6732-2013-5-1-91-98
2. Могилевец Э.В., Горелик П.В., Батвинков Н.И. Методы стимуляции регенерации при циррозе печени // Новости хирургии. 2013. Т. 21, № 3. С. 103–109. [Mogilevets E.V., Gorelik P.V., Batvinkov N.I. Methods of liver regeneration stimulation at liver cirrhosis. *Novosti khirurgii = Surgery News*, 2013, vol. 21, no. 3, pp. 103–109. (In Russ.)]
3. Хронический вирусный гепатит С и цирроз печени: руководство для врачей. Под ред. А.Г. Рахмановой. СПб.: СпецЛит, 2016. 379 с. [Chronic viral hepatitis C and liver cirrhosis: a guide for doctors. Ed. by A.G. Rakhmanova. St. Petersburg: SpetsLit, 2016. 379 p. (In Russ.)]
4. Черноусов А.Ф., Хоробрых Т.В., Карпова Р.В., Зенкова К.И. Регенерация печени при циррозе под действием криопреципитата // Новости хирургии. 2017. Т. 25, № 4. С. 350–358. [Chernousov A.F., Horobryh T.V., Karpova R.V., Zenkova K.I. Regeneration of the liver with cirrhosis under the influence of cryoprecipitate. *Novosti Khirurgii = Surgery News*, 2017, vol. 25, no. 4, pp. 350–358. (In Russ.)]
5. Desmet V. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*, 1994, vol. 19, no. 6, pp. 1513–1520. doi: 10.1016/0270-9139(94)90250-x
6. Huo T.-I., Lee S.-D., Lin H.-C. Selecting an optimal prognostic system for liver cirrhosis: the model for end-stage liver disease and beyond. *Liver Int.*, 2008, vol. 28, no. 5, pp. 606–613.
7. Ishak K., Baptista A., Bianchi L., Callea F., De Groote J., Gudat F., Denk H., Desmet V., Korb G., MacSween R.N., Phillips M., Portmann B.G., Poulsen H., Scheuer P.J., Schmid M., Thaler H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.*, 1995, vol. 22, no. 6, pp. 696–699. doi: 10.1016/0168-8278(95)80226-6
8. Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C., Chen T.S., Craig R., Kaplowitz N., Kiernan T.W., Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1981, vol. 1, pp. 431–435. doi: 10.1002/hep.1840010511
9. Lyra A.C., Soares M.B., da Silva L.F., Braga E.L., Oliveira S.A., Fortes M.F., Silva A.G., Brustolim D., Genser B., Dos Santos R.R., Lyra L.G. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2010, vol. 22, no. 1, pp. 33–42. doi: 10.1097/MEG.0b013e32832eb69a
10. Schuppan D., Krebs A., Bauer M., Hahn E.G. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ.*, 2003, vol. 10, pp. S59–S67. doi: 10.1038/sj.cdd.4401163
11. Terai S., Takami T., Yamamoto N., Fujisawa K., Ishikawa T., Urata Y., Tanimoto H., Iwamoto T., Mizunaga Y., Matsuda T., Oono T., Marumoto M., Burganova G., Fernando Quintanilha L., Hidaka I., Marumoto Y., Saeki I., Uchida K., Yamasaki T., Tani K., Taura Y., Fujii Y., Nishina H., Okita K., Sakaida I. Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2014, vol. 20, no. 3, pp. 206–210. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0527

### Авторы:

**Воробьева О.В.**, к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия;

**Ласточкин А.В.**, старший преподаватель кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Россия; врач-патологоанатом, БУ Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ Чувашии, г. Чебоксары, Россия.

### Authors:

**Vorobeva O.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation;

**Lastochkin A.V.**, Senior Lecturer, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation; Pathologist, Republican Bureau of Forensic Medicine, Cheboksary, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.11.2019  
Отправлена на доработку 16.05.2020  
Принята к печати 28.03.2021

Received 25.11.2019  
Revision received 16.05.2020  
Accepted 28.03.2021

# ОСОБЕННОСТИ АНТИФУНГАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ГРИБКОВОГО КЕРАТИТА И АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С УЧЕТОМ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК

Р.И. Валиева<sup>1,2</sup>, С.А. Лисовская<sup>1,2</sup>, К.А. Маянская<sup>3</sup>, Д.В. Самигуллин<sup>4</sup>, Г.Ш. Исаева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

<sup>3</sup> Офтальмологическая клиника «Глазная хирургия Расческов», г. Казань, Россия

<sup>4</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия

**Резюме.** Среди инфекционных болезней оппортунистические микозы занимают особое место. В литературе появляется все больше сведений о клинических и эпидемиологических аспектах инфекции, вызванных *Fusarium* spp. Частота встречаемости данной инфекции среди микробных кератитов в мире колеблется от 2 до 40% в зависимости от географического расположения страны. Колонизируя слизистые, грибы могут существовать не только в виде планктонных форм, но и, прикрепляясь к поверхности, образовывать биопленки, что приводит к возрастанию резистентности ко многим антифунгальным препаратам. В статье описан случай грибкового кератита, обусловленного грибами *Fusarium solani*, с определением профиля противогрибковой чувствительности выделенных штаммов грибов с учетом их способности к биопленкообразованию. В исследовании использовали культуру *F. solani*, выделенную от пациента, и тест-культуру *F. solani*, полученную из Всероссийской коллекции микроорганизмов. При определении чувствительности планктонных культур грибов к противогрибковым препаратам группы азолов (флуконазол, вориконазол), амфотерицина В и тербинафина выявлено, что выраженной противогрибковой активностью в отношении клинического штамма обладают антимикотики амфотерицин В и вориконазол, тогда как для планктонной культуры тест-штамма *F. solani* характерна более выраженная чувствительность ко всем группам препаратов. В связи с длительным прогрессирующим течением инфекционного процесса и высокой биопленкообразующей способностью клинического штамма *F. solani* исследована активность противогрибковых препаратов на клетки в составе биопленок, смоделированных *in vitro*. Показано, что в отношении биопленок показатели минимально ингибирующих кон-

## Адрес для переписки:

Валиева Рита Илнуровна  
420015, Россия, г. Казань, ул. Б. Красная, 67,  
ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии.  
Тел.: 8 (927) 403-15-07.  
E-mail: valievarita@yandex.ru

## Contacts:

Rita I. Valieva  
420015, Russian Federation, Kazan, Bol'shaya Krasnaya str., 67,  
Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology.  
Phone: +7 (927) 403-15-07.  
E-mail: valievarita@yandex.ru

## Для цитирования:

Валиева Р.И., Лисовская С.А., Маянская К.А., Самигуллин Д.В., Исаева Г.Ш. Особенности антифунгальной терапии при длительном инфекционном процессе: клинический случай грибкового кератита и анализ профиля противогрибковой чувствительности с учетом формирования биопленок // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 789–796. doi: 10.15789/2220-7619-FOA-1495

## Citation:

Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G. Sh. Features of antifungal therapy during long-lasting infectious process: a clinical case of fungal keratitis and profile of antifungal sensitivity based on assessing biofilm formation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i Immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 789–796. doi: 10.15789/2220-7619-FOA-1495

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 200400247. Часть работы с применением конфокальной микроскопии проводилась в рамках исследований по госзаданию ФИЦ КазНЦ РАН (№ госрегистрации ААААА181180227900839)

This work was supported by Grant No. 200400247 of the Russian Foundation for Basic Research. Part of the work with the use of confocal microscopy was carried out within the framework of research on the state order of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" (state registration No. ААААА181180227900839).

центраций превышают в 100 раз значения для планктонных культур. Проведен анализ механизмов действия противогрибковых препаратов на жизненную активность клеточных структур с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Окрашивание проводили с использованием пропидия йодида и акридина оранжевого в течение 15 мин для выявления различия между неповрежденной и поврежденной клеточной поверхностью гриба. Обнаружено, что в составе биопленки клетки сохраняли жизненную активность и под воздействием высоких концентраций веществ. Кроме того, несмотря на деструктивное воздействие значительных концентраций препарата на клеточную мембрану биопленки, ядра клеток оставались жизнеспособными. Необходимо учитывать наличие описанного в данной работе механизма резистентности у мицелиальных грибов и исследовать чувствительность биопленок к препаратам с целью оптимизации антимикотической терапии.

**Ключевые слова:** грибы *Fusarium*, грибковый кератит, инфекционный процесс, противогрибковые препараты, биопленка, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, пропидий йодид, акридин оранжевый.

## FEATURES OF ANTIFUNGAL THERAPY DURING LONG-LASTING INFECTIOUS PROCESS: A CLINICAL CASE OF FUNGAL KERATITIS AND PROFILE OF ANTIFUNGAL SENSITIVITY BASED ON ASSESSING BIOFILM FORMATION

Valieva R.I.<sup>a,b</sup>, Lisovskaya S.A.<sup>a,b</sup>, Mayanskaya K.A.<sup>c</sup>, Samigullin D.V.<sup>d</sup>, Isaeva G.Sh.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation

<sup>b</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

<sup>c</sup> Ophthalmological Clinic "Eye Surgery of Raschekov", Kazan, Russian Federation

<sup>d</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russian Federation

**Abstract.** Among infectious diseases, opportunistic mycoses hold a special place. There has been accumulating a lot of evidence regarding the clinical and epidemiological aspects of infection caused by *Fusarium* spp., which global incidence rate among microbial keratitis ranges from 2 to 40% depending on the geographical location of the country. Colonizing mucous membranes, fungi can exist not only in the form of plankton, but form biofilms after surface attachment, which leads to elevated resistance to multiple antifungal agents. Here we describe a clinical case of fungal keratitis due to *Fusarium solani* by determining profile of the antifungal sensitivity for isolated fungal strains, by taking into account their potential for biofilm formation. We used an *F. solani* culture isolated from the patient as well as *F. solani* test culture obtained from the Russian National Collection of Microorganisms. While determining the sensitivity of fungal planktonic cultures to antifungal agents from the azole group (fluconazole, voriconazole), amphotericin B and terbinafine, it was revealed that antimycotics amphotericin B and voriconazole exerted a marked antifungal activity against clinical isolate, whereas the plankton *F. solani* test culture was more sensitive to all groups of antifungal agents. Due to a long-lasting progressive course of the infectious process and the high biofilm-forming ability of the clinical strain *F. solani*, the activity of antifungal agents on biofilm cells was modeled and examined *in vitro*. It was shown that regarding to the fungal biofilms, value of the minimally inhibitory concentration exceeded those for planktonic cultures by 100-fold. The mechanisms of action for antifungal agents on vital parameters of fungal cell structures were analyzed by using confocal laser scanning microscopy after staining samples with propidium iodide and acridine orange for 15 min to detect changes between intact and damaged cell surface. It was found that within the biofilm fungal cells preserved viability even after exposure to high concentrations of antifungals. In addition, despite the fungicidal drug activity at substantial concentrations acting on the biofilm cell membrane, the cell nuclei remained viable. Owing to the presence of the mechanism of resistance in mycelial fungi shown in the study, it is necessary to take into account and investigate characteristics of biofilms in terms of drug sensitivity that will allow to optimize a choice of antimicrobial therapy.

**Key words:** *Fusarium*, fungal keratitis, infectious process, antifungal agents, biofilm, confocal laser scanning microscopy, propidium iodide, acridine orange.

## Введение

Среди инфекционных болезней оппортунистические микозы занимают особое место, поскольку число условно-патогенных микромицетов значительно больше, чем истинных патогенов [35]. В литературе появляется все больше сведений о клинических и эпидемиологических аспектах инфекции, вызванных *Fusarium* spp. [10, 11, 14, 15, 16]. Грибковые кератиты, обусловленные данными микромицетами, регистрировались в основном в тропических и субтропичес-

ких странах, преимущественно в агропромышленных регионах, но в последнее время в связи с активным использованием контактных линз часто выявляются и в регионах с умеренным климатом, в том числе и в России [1, 2, 4, 17, 36]. Основным предрасполагающим фактором для кератитов данной этиологии является механическая травма глаза, чаще всего обусловленная длительным использованием мягких контактных линз [33, 35]. На поврежденной поверхности роговицы происходит инвазия грибов, в результате чего они могут проникать в нижележащие

слои, осложняя течение заболевания [10, 16]. К тому же имеются данные о том, что длительное использование антибиотиков и кортикостероидов способствует быстрой колонизации микроорганизмов на месте внедрения [13, 36].

Грибы рода *Fusarium* имеют выраженную устойчивость к большинству противогрибковых препаратов. По своей природе они устойчивы к эхинокандинам, у некоторых видов выявлены высокие значения минимально ингибирующей концентрации (МИК) для противогрибковых препаратов группы азолов [1, 36]. Необходимо учитывать тот факт, что грибы, колонизируя слизистые, могут существовать не только в виде планктонных форм, но и, прикрепляясь к поверхности, образовывать биопленки [3, 5]. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), в период с 2005 по 2006 гг. было выявлено 318 случаев грибкового кератита, обусловленного *Fusarium* spp. [20]. Важно отметить, что на поверхности мягких контактных линз обследованных пациентов микромицеты образовывали биопленки [33]. Способность к биопленкообразованию — один из основных механизмов, приводящих к возрастанию резистентности ко многим антифунгальным препаратам [6, 22].

В этой статье мы описываем клинический случай кератита, обусловленного *Fusarium solani*. Целью исследования является анализ профиля противогрибковой чувствительности штаммов грибов *in vitro* с оценкой их способности к биопленкообразованию.

## Материалы и методы

В исследовании использовалась культура *F. solani* (FSSC-17), выделенная от пациента, и тест-культура *F. solani* (F-819), полученная из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

**Выделение культуры *F. solani* и условия роста.** Микропрепарат из содержимого передней камеры глаза пациента готовили с применением раствора, состоящего из 10%-ного раствора гидроксида калия (KOH), 400 мл/л диметилсульфоксида (DMSO), 600 мл/л 0,001% метиленового синего и дистиллированной воды. Препараты просматривали в световом и люминесцентном микроскопах. Отмечали наличие или отсутствие морфологических структур.

Исследуемый биоматериал культивировали на модифицированной среде Сабуро с давлением ципрофлоксацина в количестве 50 ед/мл среды при температуре  $+30 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 2–5 суток. Производили расчет численности клеток грибов в смыве с 1 тампона в 1 мл дистиллированной воды. Выделенные штаммы идентифицировали по основным микроскопическим и культуральным критериям [24], а также

по характеру протеомного профиля, который определяли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) [15].

**Формирование биопленок.** Конидиальную суспензию штаммов *F. solani*, выращенных на среде Сабуро, доводили до конечной концентрации  $1 \times 10^6$  конидии/мл в жидкой среде Сабуро. Затем по 200 мкл этой суспензии добавляли в каждую лунку 96-луночного полистирольного микротитровального планшета с плоским дном. Для получения зрелой биопленки суспензию инкубировали при  $30^\circ\text{C}$  в течение 5 суток. В лунки со сформированными биопленками добавляли 125 мкл водного раствора 1%-ного кристаллического фиолетового и инкубировали 20 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Оптическую плотность регистрировали с использованием планшет-ридера (Biotek EL × 808, США) со светофильтром 620 нм. Каждый опыт проводили в 10 повторах.

**Определение чувствительности к противогрибковым препаратам.** Чувствительность планктонных культур и биопленок грибов к препаратам группы азолов (флуконазол, вориконазол), амфотерицину В и тербинафину *in vitro* проводили стандартным методом в микроразведениях по протоколам CLSIM38-A3 [12, 18]. Антимикотики добавляли к предварительно отмытым биопленкам методом серийных разведений в концентрации 1600–0,78 мкг/мл и инкубировали двое суток. Анализ механизмов действия противогрибковых препаратов на жизненную активность клеточных структур проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (TCS SP5; Leica Microsystems, Германия) [9]. Образцы окрашивали с использованием пропидия йодида (PI — зеленый флуоресцентный) и акридина оранжевого (АО — зеленый флуоресцентный) в течение 15 мин для выявления различия между неповрежденной и поврежденной клеточной поверхностью гриба [26]. Максимум поглощения/испускания у PI, связанного с ДНК, — 538/617 нм, для АО — 502/525 нм. Максимум поглощения/испускания у АО, связанного с РНК, — 460/650 нм. Для контроля исследования оценивали рост и образование биопленок в отсутствие антимикотиков. Каждый опыт повторяли трехкратно для уменьшения влияния случайных явлений на результат исследования.

## Описание клинического случая

Пациентка М., 1963 года рождения, обратилась в клинику на третий день заболевания с жалобами на ощущение инородного тела в левом глазу, слезотечение, светобоязнь. Из анамнеза выявлено, что за 2 дня до появления жалоб она купалась в лесном озере; ранее (2,5 недели назад) перенесла острый бактериальный кера-

тит и конъюнктивит обоих глаз; в связи с дефектами остроты зрения длительно носит мягкие контактные линзы. Пациентка самостоятельно начала лечение — закапывала в левый конъюнктивальный мешок капли «Комбинил» (антибактериальный препарат группы фторхинолонов) в течение нескольких дней, после чего состояние ухудшилось, затем обратилась к офтальмологу по месту жительства. По данным объективного осмотра были обнаружены поверхностные инфильтраты роговицы серовато-белого цвета в виде «пылинок», перикорнеальная инъекция (рис. 1, вклейка, с. IV). На фоне лечения левофлоксацином в виде инстилляций в конъюнктивальный мешок было отмечено значительное улучшение, однако через 2 недели сформировался серовато-желтоватый инфильтрат в форме диска, который очень быстро начал изъязвляться по краям в виде кольца.

Пациентка госпитализирована с предварительным диагнозом «острый кератоувеит», ей назначено местное консервативное лечение: ацикловир, офлоксацин, тобрамицин и системные препараты: внутривенное введение ацикловира и цефуроксима. Выбранная тактика лечения оказалась неэффективной: сохранялись смешанная инъекция конъюнктивы, отек роговицы, складки десцеметовой оболочки, сероватый рыхлый округлый проминирующий инфильтрат с перифокальной поверхностной эрозией, гипопион, образовалась мацерация по верхнему веку. Результаты микробиологического анализа с поверхности конъюнктивы и роговицы, а также анализ крови на IgM вируса простого герпеса оказались отрицательными, после чего пациентке был проведен локальный кросслинкинг. Наблюдалась положительная динамика в виде остановки развития процесса и уменьшения размеров инфильтрата. Однако эффекта хватило ненадолго, процесс снова начал прогрессировать и распространяться по роговице.

Спустя месяц от начал заболевания пациентке была проведена глубокая послойная кератопластика (DALK). Уже через неделю при объективном осмотре было выявлено возникновение гипопиона и начало вторичной инфильтрации (рис. 2, вклейка, с. IV).

Через 2 недели пациентке была проведена сквозная кератопластика. В ходе операции выяснилось, что передняя камера полностью заполнена белой рыхлой массой, по типу смеси фибрина и продуктов жизнедеятельности грибов и самих грибов. Переднюю камеру очистили от этой массы, отделили ее от радужки, зрачка. Угол передней камеры также был запаян, его попытались распаковать и очистили от тягучей массы. Пересадка закончилась подшиванием трансплантата узловыми швами. Содержимое передней камеры глаза пациента было направ-

лено на микробиологическое исследование. До заключения микробиологической лаборатории назначено активное местное и системное лечение: инъекции 0,2% раствора амфотерицина В под конъюнктиву, массивные дозы антибактериальной (Сигницеф, Тобрекс) и гормональной противовоспалительной терапии внутривенно.

В результате исследования биоматериала, проведенного лабораторией микологии, был выявлен обильный рост грибов *F. solani* (FSSC) и определены *in vitro* МИК для противогрибковых препаратов, широко используемых для элиминации данных микромицет.

К этому моменту у пациента возник зрачковый блок, передние и задние синехии, хрусталик набухал, развилась офтальмогипертензия. В связи с этим было принято решение о проведении факоэмульсификации с имплантацией интраокулярной линзы и разделением всех спаек. В течение следующих двух недель, несмотря на антифунгальную местную и общую терапию, на новом трансплантате на границе «донор—реципиент» образовался инфильтрат, который также быстро распространился по всему трансплантату и лимбу. В связи с угрозой перфорации роговицы было принято решение о смене противогрибкового препарата и дозировки. Было начато активное местное и системное лечение вориконазолом (промывание передней камеры 5%-ным раствором вориконазола, приготовленным *ex tempore*, а также внутривенное введение вориконазола по 800 мкг/мл на два приема).

В ходе активного лечения произошло расплавление трансплантата и перфорация роговицы с тампонадой радужки. В течение суток пациентке была проведена urgentная пересадка роговично-склерального диска и задняя витректомиа без поднятия внутренней пограничной мембраны (так как по В-сканированию намечались признаки витреита). Была продолжена терапия вориконазолом. Через 3 недели в соскобе с роговицы грибы *Fusarium spp.* или другие представители микробной флоры обнаружены не были.

На сегодняшний день прошло более 12 месяцев с момента последней пересадки (рис. 3, вклейка, с. IV). OS спокоен, признаков инфекции нет, признаков отторжения трансплантата также нет, эпителизация трансплантата произошла полностью.

## Результаты

В лаборатории микологии ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии микроскопическим методом была проведена оценка окрашенного препарата содержимого передней камеры глаза пациента. Также выполнено прямое микроскопирование биоматериала в на-

тивном препарате, что позволило обнаружить микроморфологические особенности грибов (рис. 4, III обложка). На плотной среде Сабуро получен рост колоний микромицетов во всех пяти точках первичного посева (рис. 5, III обложка).<sup>\*</sup> Выросшие культуры нитчатых грибов по макро- и микроморфологическим признакам определены как *Fusarium* spp. и далее с помощью масс-спектрометра идентифицированы как *F. solani* (FSSC).

Оценка степени формирования биопленок исследуемых штаммов показала, что все штаммы грибов *F. solani* формируют биопленку. Проведенный анализ фаз формирования биопленок показал, что полное формирование и стабилизация биопленочных структур отмечается на 3 день инкубации и имеет существенные различия у изучаемых штаммов. Среднее значение оптической плотности биопленок у клинического штамма *F. solani*, выделенного из передней камеры глаза пациента, составило  $0,199 \pm 0,015$ , что существенно выше (в 1,5–3 раза), чем у тест-штамма *F. solani* ( $0,063 \pm 0,024$ ). Максимальные значения для исследуемой группы составили 0,317 оптических единиц для клинического штамма и 0,098 — для тест-культуры (табл. 1).

Минимальные подавляющие концентрации антимикотиков по отношению к планктонной культуре клинического штамма *F. solani* оказались высокими (табл. 2). Только в отношении амфотерицина В и вориконазола обнаружены низкие показатели МИК. Однако, несмотря на то что амфотерицин В и вориконазол проявляли антифунгальную активность к планктонным культурам, в отношении биопленок, сформированных на 96-луночных планшетах, показатели МИК были высокими (более 100 раз). Планктонная культура тест штамма *F. solani* обладала чувствительностью ко всем группам препаратов, кроме флуконазола, однако в составе биопленок МИК были низкими.

Анализ механизмов действия противогрибковых препаратов на жизненную активность клеточных структур показал, что в составе био-

пленок клетки сохраняли жизненную активность и под воздействием высоких концентраций веществ. Кроме того, несмотря на фунгицидную активность препарата в значительных концентрациях на клеточную мембрану биопленок грибов *F. solani*, ядра клеток оставались жизнеспособными (рис. 6, III обложка).

## Обсуждение

Кератиты, вызванные грибами рода *Fusarium*, ассоциированы с высокой распространенностью данных микромицетов в окружающей среде. Частота встречаемости данной инфекции среди микробных кератитов в мире колеблется от 2 до 40% в зависимости от географического расположения страны [34, 36]. В развивающихся странах с жарким влажным климатом грибковый кератит в основном связан с травмой глаза у работников сельского хозяйства, тогда как в странах с умеренным климатом ношение мягких контактных линз является предполагаемым фактором риска с частотой до 31,6% [16]. К тому же в ретроспективном анализе Wong T.Y. и соавт. было показано, что грибковый кератит, обусловленный *Fusarium* spp., с большей вероятностью приводит к перфорации роговицы, чем бактериальный кератит (OR = 5,86, 95%, ДИ, 2,06–16,69), и вызывает необратимые изменения [7].

В описанном клиническом случае симптомы заболевания у пациента появились после отдыха на озере, при тесном контакте с растительной лесной подстилкой, где могли находиться споры и микроконидии *Fusarium* spp., известные своей фитопатогенной активностью, широким ареалом обитания и высокой устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов [13]. На фоне недавно перенесенного острого бактериального кератита и конъюнктивита в комплексе с длительным использованием мягких контактных линз произошло повреждение поверхности роговицы, что послужило возможной причиной инвазии грибов в нижележащие слои, приводя к последующему некрозу тканей окружающей области. К тому же огромные воз-

**Таблица 1. Оптическая плотность биопленок, сформированных штаммами *F. solani*, M±SD**

Table 1. The optical density of biofilms formed by *F. solani* strains, M±SD

Культура Culture	Время инкубации, сутки Incubation time, days				
	1	2	3	4	5
Клинический штамм FSSC-17 Clinical strain FSSC-17	0,056±0,001	0,116±0,018	0,225±0,015	0,281±0,018	0,317±0,013
Тест-культура F-819 Test strain F-819	0,011±0,001	0,028±0,001	0,085±0,011	0,092±0,015	0,098±0,012

**Примечание.** Даны значения  $D_{620}$  (за вычетом фона) поглощения красителя в лунках микропанели. Опыт проведен в 10 повторах.

Note.  $D_{620}$  values (background subtraction) for dye absorption in the microplate wells are shown. The experiment was conducted in 10 repeats.

**Таблица 2. Результаты чувствительности к противогрибковым препаратам штаммов *F. solani*, выращенных в состоянии планктонных клеток и в составе биопленок, мкг/мл**

Table 2. Sensitivity to antifungal drugs in *F. solani* strains grown as plankton cells and within biofilm are shown, µg/ml

Противогрибковое средство Antifungal agent	Клинический штамм FSSC-17 Clinical strain FSSC-17		Тест-культура F-819 Test strain F-819	
	П-МИК P-MIC	Б-МИК B-MIC	П-МИК P-MIC	П-МИК B-MIC
<b>Амфотерицин В</b> Amphotericin B	2	1400	2	200
<b>Вориконазол</b> Voriconazole	8	800	4	100
<b>Тербинафин</b> Terbinafine	16	> 1600	4	100
<b>Флуконазол</b> Fluconazole	64	> 1600	32	50
<b>Итраконазол</b> Itraconazole	64	> 1600	6	50

**Примечание.** П-МИК — минимальная подавляющая концентрация у планктонных форм; Б-МИК — концентрация антимикотика, приводящая к снижению оптической плотности на 80% у биопленок.

Note. P-MIC — the minimum inhibitory concentration in plankton cultures; B-MIC — the concentration of antimicrobial agent resulting in decrease in optical 80% reduced biofilm density.

возможности, заложенные в геноме грибов *Fusarium* spp., — крайне высокая адгезивность микроколониий, наличие широкого спектра протеолитических ферментов, способность к быстрому росту — способствуют возникновению клинических симптомов и осложнений [10, 16, 19, 23]. Экспериментальным путем на лабораторных животных было выявлено, что грибы *Fusarium* индуцируют выработку провоспалительных и хемотаксических цитокинов в слизистые роговицы, что приводит к активации нейтрофилов, и стероидная и/или антибактериальная терапия вызывает нерегулируемый рост грибов и последующее разрушение роговицы [21, 33, 37]. В связи с этим использование антибактериального препарата широкого спектра действия на начальном этапе инфицирования могло привести к быстрой колонизации микромицетами роговицы глаза.

Прямое микроскопическое исследование с последующим культивированием образцов роговицы до сих пор остается золотым стандартом для диагностики грибов. Полученную культуру, идентифицированную нами как *F. solani*, исследовали на чувствительность к противогрибковым препаратам, широко применяемым в клинической практике. Известно, что *Fusarium* spp. имеют низкую чувствительность к антифунгальным препаратам, причем вид *F. solani* обладает наибольшей устойчивостью [25, 29, 31, 32]. В опытах на лабораторных животных доказано, что *F. solani* обладает большей вирулентной активностью и плохо поддается терапии в отличие от распространенных видов *F. oxysporum* и *F. verticillioides* [27, 28]. В нашем исследовании у амфотерицина В

обнаружены низкие показатели МПК к планктонным культурам как клинического штамма, так и тест-культуры *F. solani*. Несмотря на то, что этот препарат рекомендуется для лечения инфекций, вызванных грибами *Fusarium* spp., многие исследования, в том числе и на лабораторных животных, доказывают его низкую эффективность [16, 21]. В связи с высокой биопленкообразующей способностью клинического штамма *F. solani* — и длительным, прогрессирующим течением инфекционного процесса соответственно — нами было принято решение исследовать активность противогрибковых препаратов на биопленочных структурах, смоделированных *in vitro*. Показано, что образованная биопленка клинического штамма увеличивает резистентность к антифунгальным препаратам в 100 и более раз, что проявляется выраженной резистентностью ко всем видам препаратов. Самая низкая МПК была обнаружена у вориконазола. Данный препарат был эффективен во многих клинических случаях микозов, вызванных *Fusarium* spp. [8, 14, 30]. В связи с полученными данными было принято решение о местном и системном применении вориконазола как эффективного препарата для элиминации биопленочной грибковой флоры.

В результате проделанной работы было показано наличие у грибов *F. solani* ведущего фактора патогенности — биопленкообразования, позволяющего быстро адаптироваться к факторам агрессии макроорганизма. Используемый широкий арсенал антимикробных препаратов в клинической практике не только не уменьшает клинические проявления заболевания,

но и порождает новую проблему, связанную с формированием биопленочных структур и многочисленных микроконидий, что может повысить инвазивность и колонизационную активность гриба. Таким образом, характерная — мультифакторная патогенность грибов *F. solani* и их высокая биопленкообразующая способность могут стать поводом к пересмотру клинических рекомендаций по оценке противогрибковой активности препаратов.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## Благодарности

Авторы благодарят ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН за техническую поддержку проведенных исследований.

## Список литературы/References

1. Астахов Ю.С., Скрыбина Е.В., Коненкова Я.С., Касымов Ф.О., Богомолова Т.С., Пинегина О.Н. Диагностика и лечение грибковых кератитов // Офтальмологические ведомости. 2013. Т. 6, № 2. С. 75–80. [Astakhov Yu.S., Scriabin E.V., Konenkova Y.S., Kasymov F.O., Bogomolova T.S., Pinegin O.N. Diagnosis and treatment of fungal keratitis. *Oftalmologicheskie vedomosti = Ophthalmology Journal*, 2013, vol. 6, no. 2, pp. 75–80. (In Russ.)] doi: 10.17816/OV11363-73
2. Делягин В.М., Мельникова М.Б., Першин Б.С., Серик Г.И., Джандарова Д.Т. Грибковые поражения глаз (диагностика, лечение) // Практическая медицина. 2015. Т. 1. С. 100–105. [Delyagin V.M., Melnikova M.B., Pershin B.S., Serik G.I., Dzhandarova D.T. Fungal eye lesions (diagnosis, treatment). *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2015, vol. 1, pp. 100–105. (In Russ.)]
3. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? // Практическая медицина. 2011. Т. 5. С. 7–11. [Maltsev S.V., Mansurova G.Sh. What is a biofilm? *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2011, vol. 5, pp. 7–11. (In Russ.)] doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-8-48-53
4. Полтанова Т.И., Белоусова Н.Ю. Рецидив грибкового кератита в роговичном трансплантате // Казанский медицинский журнал. 2018. Т. 99, № 1. С. 148–150. [Poltanova T.I., Belousova N.Yu. Relapse of fungal keratitis in the corneal graft. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2018, vol. 99, no. 1, pp. 148–150. (In Russ.)] doi: 10.17816/KMJ2018-148
5. Рахматулина М.Р., Нечаева И.А. Биопленки микроорганизмов и их роль в формировании резистентности к антибактериальным препаратам // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. Т. 91, № 2. С. 58–62. [Rakhmatulina M.R., Nechaev I.A. Biofilms of microorganisms and their role in the formation of resistance to antibacterial drugs. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereologists*, 2015, vol. 91, no. 2, pp. 58–62. (In Russ.)] doi: 10.25208/0042-4609-2015-91-2-58-62
6. Шварц Т.А. Биопленки как микробное сообщество // Вестник КГУ. 2015. № 1. С. 41–44. [Schwartz T.A. Biofilms as a microbial community. *Vestnik KGU = Bulletin of KSU*, 2015, no. 1, pp. 41–44. (In Russ.)]
7. Ansari Z., Miller D., Galor A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 2013, vol. 7, no. 3, pp. 209–218. doi: 10.1007/s12281-013-0150-110.1007/s12281-013-0150-1
8. Aoun M. Voriconazole: a new weapon against invasive fungal infections. *Rev. Med. Brux.*, 2004, vol. 25, no. 3, pp. 166–171.
9. Bayguinov P.O., Oakley D.M., Shih C.C., Geanon D.J., Joens M.S., Fitzpatrick J.A.J. Modern laser scanning confocal microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.*, 2018, vol. 85, no. 1, pp. 39–45. doi: 10.1002/cpey.39
10. Bigley V.H., Duarte R.F., Gosling R.D., Kibbler C.C., Seaton S., Potter M. Fusarium dimerum infection in a stem cell transplant recipient treated successfully with voriconazole. *Bone Marrow Transplant.*, 2004, vol. 3, no. 9, pp. 815–817. doi: 10.1038/sj.bmt.1704660
11. Bograd A., Seiler T., Droz S., Zimmerli S., Früh B., Tappeiner C. Bacterial and fungal keratitis: a retrospective analysis at a university hospital in Switzerland. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 2019, vol. 236, no. 4, pp. 358–365. doi: 10.1055/a-0774-7756
12. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 3<sup>rd</sup> ed. *Pennsylvania: CLSI*, 2017. 63 p.
13. Coleman J.J. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol. Plant. Pathol.*, 2016, vol. 17, no. 2, pp. 146–158. doi: 10.1111/mpp.12289
14. Consigny S., Dhedin N., Datry A., Choquet S., Leblond V., Chosidow O. Successful voriconazole treatment of disseminated fusarium infection in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 37, no. 2, pp. 311–313. doi: 10.1086/375842
15. De Carolis E., Posteraro B., Lass-Flörl C., Tortorano A.M., Sanguinetti G., Fadda M. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 5, pp. 475–484. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x
16. Dignani M.C., Anaissie E. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, vol. 10, no. 1, pp. 67–75. doi: 10.1111/j.1470-9465.2004.00845.x
17. Dóczi I., Gyetvai T., Kredics L., Nagy E. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, vol. 10, no. 9, pp. 773–776. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00909.x
18. Espinel-Ingroff A., Colombo A.L., Cordoba S. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 1079–1084. doi: 10.1128/AAC.02456-15
19. Fernandes M., Vira D., Dey M., Tanzin T., Kumar N., Sharma S. Comparison between polymicrobial and fungal keratitis: clinical features, risk factors, and outcome. *Amer. J. Ophthalmol.*, 2015, vol. 160, no. 5, pp. 873–881. doi: 10.1016/j.ajo.2015.07.028
20. Chang D.C., Grant G.B., O'Donnell K., Wannemuehler K.A., Noble-Wang J., Rao C.Y., Jacobson L.M., Crowell C.S., Sneed R.S., Lewis F.M., Schaffzin J.K., Kainer M.A., Genese C.A., Alfonso E.C., Jones D.B., Srinivasan A., Fridkin S.K., Park B.J. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA*, 2006, vol. 296, no. 8, pp. 953–963. doi: 10.1001/jama.296.8.953

21. Guarro J., Pujol I., Mayayo E. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, no. 5, pp. 1256–1257. doi: 10.1128/AAC.43.5.1256
22. Gupta A.K., Foley K.A. Evidence for biofilms in onychomycosis. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, 2019, vol. 154, no. 1, pp. 50–55. doi: 10.23736/S0392-0488.18.06001-7
23. Homa M., Galgóczy L., Manikandan P., Narendran V., Sinka R., Cserecics A., Vágvolgyi C., Kredics L., Papp T. South Indian isolates of the *Fusarium solani* species complex from clinical and environmental samples: identification, antifungal susceptibilities, and virulence. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9: 1052. doi: 10.3389/fmicb.2018.01052
24. Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of Clinical Fungi. 2<sup>nd</sup> edition. *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili*, 2000. 1126 p.
25. Lewis R.E., Wiederhold N.P., Klepser M.E. In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 3, pp. 945–951. doi: 10.1128/AAC.49.3.945-951.2005
26. Mascotti K., McCullough J., Burger S.R. HPC Viability Measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*, 2000, vol. 40, no. 6, pp. 693–696. doi: 10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x
27. Mayayo E., Pujol I., Guarro J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J. Med. Microbiol.*, 1999, vol. 48, no. 4, pp. 363–366.
28. Ortoneda M., Capilla J., Pastor F.J., Pujol I., Guarro J. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 7, pp. 2273–2275. doi: 10.1128/AAC.46.7.2273-2275.2002
29. Paphitou N.I., Ostrosky-Zeichner L., Paetznick V.L., Rodriguez J.R., Chen E., Rex J.H. In vitro activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, no. 10, pp. 3298–3300. doi: 10.1128/AAC.46.10.3298-3300.2002
30. Perfect J.R., Marr K.A., Walsh T.J., Greenberg R.N., DuPont B., de la Torre-Cisneros J., Just-Nübling G., Schlämm H.T., Lutsar I., Espinel-Ingroff A., Johnson E. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, vol. 36, no. 9, pp. 1122–1131. doi: 10.1086/374557
31. Pujol I., Guarro J., Gené J., Sala J. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1997, vol. 39, no. 2, pp. 163–167. doi: 10.1093/jac/39.2.163
32. Sabatelli F., Patel R., Mann P.A., Mendrick C.A., Norris C.C., Hare R., Loebenberg D., Black T.A., McNicholas P.M. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, no. 6, pp. 2009–2015. doi: 10.1128/AAC.00163-06
33. Tarabishy A.B., Aldabagh B., Sun Y. MyD88 regulation of *Fusarium* keratitis is dependent on TLR4 and IL-1R1 but not TLR2. *J. Immunol.*, 2008, vol. 181, no. 1, pp. 593–600. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.593
34. Thomas P.A., Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013, vol. 19, no. 3, pp. 210–220. doi: 10.1111/1469-0691.12126
35. Van Burik J.A., Magee P.T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2001, vol. 55, pp. 743–772. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.743
36. Walther G., Stasch S., Kaerger K., Hamprecht A., Roth M., Cornely O.A., Geerling G., Mackenzie C.R., Kurzai O. *Fusarium* Keratitis in Germany. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 10, pp. 2983–2995. doi: 10.1128/JCM.00649-17
37. Wu T.G., Keasler V., Mitchell B.M., Wilhelmus K.R. Immunosuppression affects the severity of experimental *Fusarium solani* keratitis. *J. Infect. Dis.*, 2004, vol. 190, pp. 192–198. doi: 10.1086/421300

**Авторы:**

**Валиева Р.И.**, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия; ассистент кафедры микробиологии им. академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

**Лисовская С.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии, ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия; доцент кафедры микробиологии им. академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

**Маянская К.А.**, врач-офтальмолог, офтальмологическая клиника «Глазная хирургия Расческов», г. Казань, Россия;

**Самигуллин Д.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов, Казанский институт биохимии и биофизики, Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия;

**Исаева Г.Ш.**, д.м.н., профессор, зам. директора ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия; зав. кафедрой микробиологии им. академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия.

**Authors:**

**Valieva R.I.**, Junior Researcher, Laboratory of Microbiology, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Assistant Professor, V.M. Aristovskiy Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

**Lisovskaya S.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Microbiology, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Associate Professor, V.M. Aristovskiy Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation;

**Mayanskaya K.A.**, Ophthalmologist, Ophthalmological Clinic "Eye Surgery of Rascheskov", Kazan, Russian Federation;

**Samigullin D.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Biophysics of Synaptic Processes, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russian Federation;

**Isaeva G.Sh.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director of the Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; Head of the V.M. Aristovskiy Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

### Основные виды статей, публикуемых в журнале

#### Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

#### Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

#### Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

#### Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

##### Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

##### Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

##### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

#### Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

### Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

#### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

#### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

#### Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
  - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
    - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
    - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
    - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
    - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
    - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
    - полное название статьи, направляемой в редакцию;
    - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
    - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
    - дата отправления работы.
  - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
  - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
  - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
  - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
  - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
  - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
  - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок\_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a> . 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.argp.org](http://www.argp.org) — индекс 41392.**  
**Цена свободная.**  
**Подписка на электронную версию журнала**  
**на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

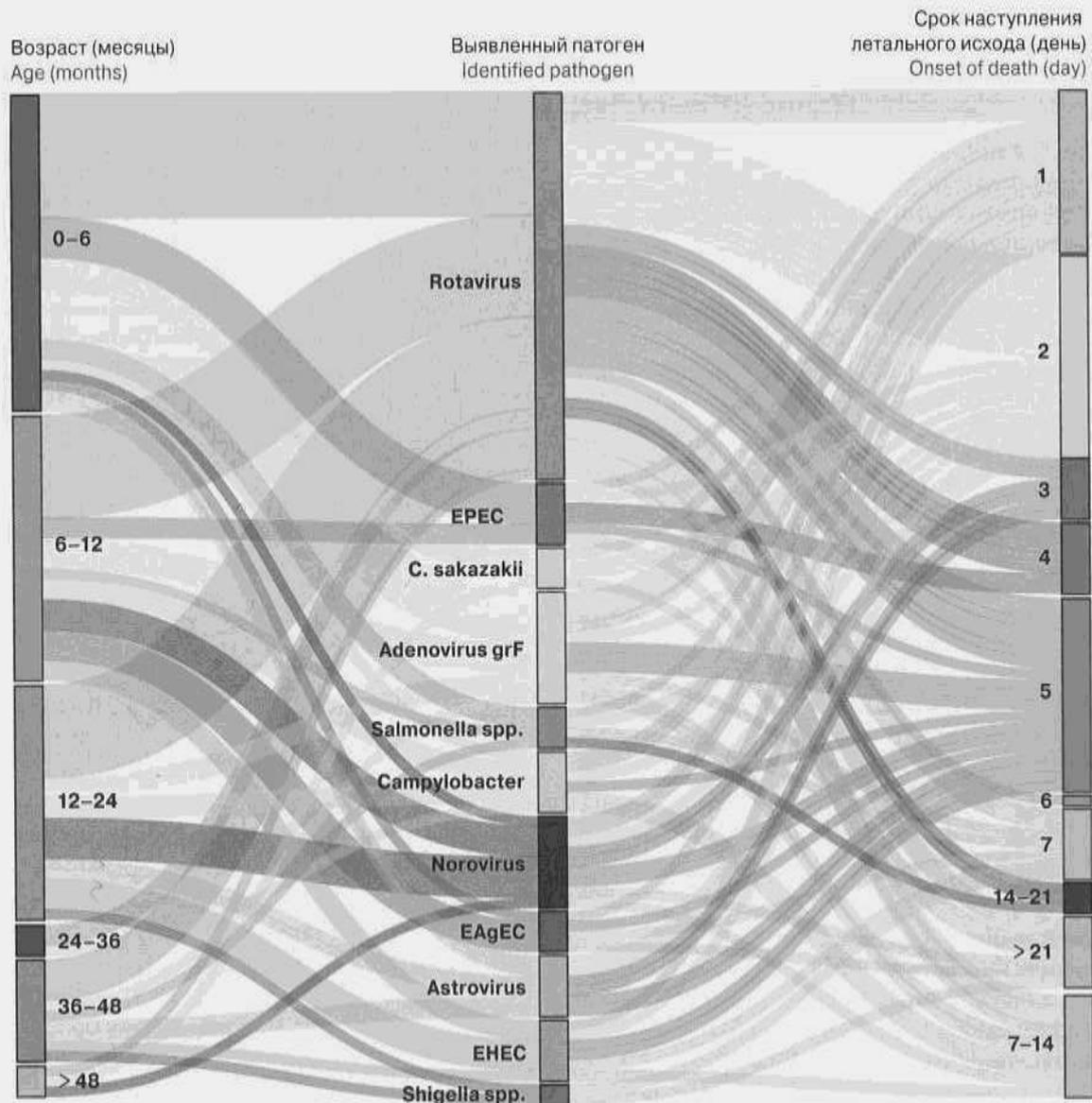
Алексеев А.Ю.	723	Лякова М.Е.	671	Личная Е.В.	692	Соболев И.А.	723
Аношина А.В.	723	Екатеринчев Д.А.	737	Максимова И.М.	683	Сомнина А.А.	723
Афанасьев М.С.	683, 737	Есякова Е.Ю.	723	Малецкая О.В.	617	Сорокин В.М.	701
Афанасьев С.С.	683, 737	Зверев В.В.	737	Масейкина А.А.	663	Степаненко И.С.	663
Борисова О.Ю.	683	Зимина Е.М.	763	Маянская К.А.	789	Столяров К.А.	723
Бошьян Р.Е.	737	Зотова Н.В.	649	Михайлова Н.А.	763	Сулейманова М.Э.	737
Буданова Е.В.	737	Исаева Г.Ш.	789	Москвина Т.В.	624	Сьед Б.	771
Буй-Тянь Н.	692	Казачкова Е.А.	723	Мурашкина Т.А.	723	Тенникова Т.Б.	777
Валиева Р.И.	789	Калинина О.В.	692	Нгуен Т.Т.	692	Токаревич Н.К.	707
Васильев В.В.	635	Калиниченко Е.О.	763	Несвижский Ю.В.	737	Тоголян А.А.	609
Веселова О.А.	752	Калошин А.А.	763	Павлова А.С.	752	Удогова Е.С.	771
Вишня А.А.	777	Кафарская Л.И.	683	Паркина Н.В.	752	Урбан Ю.Н.	683, 737
Во В.К.	692	Кирюхина Л.Д.	671	Петрова О.А.	692	Фалеев А.В.	723
Водопьянов А.С.	701	Кожухметова Т.А.	752	Пименова А.С.	683	Фам Т.Х.Ж.	692
Водчкова Е.В.	737	Комиссаров А.Б.	723	Писанов Р.В.	701	Филина Ю.С.	737
Вольникова А.С.	617	Комиссарова Т.В.	723	Подкозин А.Т.	752	Цыбульская А.В.	624
Воробьева О.В.	784	Коновадова Т.А.	752	Позднякова Л.Л.	723	Чагина И.А.	683
Воропаев А.Д.	737	Корженкова М.П.	683	Поляков Д.С.	777	Чан Т.Н.	692
Воропаева В.А.	737	Коржиков-Влах В.А.	777	Попова А.Ю.	609	Чаплин А.В.	683
Гадуа Н.Т.	683	Кравченко Л.В.	745	Прокопьева Е.А.	723	Черешнев В.А.	649
Гильдеева К.А.	771	Крикун В.В.	683	Рогозина Н.В.	635	Шавловский М.М.	777
Гнатив Б.Р.	707	Кудрявцев И.В.	777	Рукосуева Т.В.	771	Шаршов К.А.	723
Гошина А.Д.	777	Кулешов К.В.	752	Самигуллин Д.В.	789	Шестопалов А.М.	723
Гришева А.А.	635	Куличенко А.Н.	617	Саркисян Н.С.	617	Шелканов М.Ю.	624
Гудкова Е.С.	771	Курская О.Г.	723	Сахабеев Р.Г.	777	Эсмедляева Д.С.	671
Гусев Е.Ю.	649	Кясова Д.Х.	752	Сварваль А.В.	701	Яблонский П.К.	671
Гусева А.Н.	752	Ласточкин А.В.	784	Серебряная Н.Б.	671	Якунина О.Ю.	683
Далелова З.Х.	752	Леонова Н.В.	723	Симкина О.А.	723	Ямашкин С.А.	663
Даниленко Д.М.	723	Лисовская С.А.	789	Синицына Е.С.	777	Яцышина С.Б.	752
Дмитриев А.В.	692	Лиханская Е.И.	737	Сластников Е.Д.	663		

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аденозин	671	зеленый флуоресцентный белок	777	провинция Ха Занг	692
аденозиндезаминидаза	671	золото	771	пропидий йодид	789
акридин оранжевый	789	зооноз	617	противовирусная терапия	624
активность $\beta$ -галактозидазы	663	интерферонотерапия	624	противогрибковые препараты	789
анатоксин	763	интерфероны	624	профессиональные риски	707
антенатальная смертность	635	инфекционная диарея	752	профилактика	707
анти-HEV IgG	692	инфекционный процесс	789	пуринергетическая система	671
антибактериальная активность	663	клеточный иммунный ответ	777	ПЦР	701, 752
антибактериальный эффект	771	клещевой боррелиоз	707	радикалы кислорода и азота	671
антибиотикорезистентность	771	клещевой вирусный энцефалит	707	рекомбинантная вакцина	763
антимикотикорезистентность	737	коллективный иммунитет	609	рекомбинантный белок	763
антитела к SARS-CoV-2	609	конфокальная лазерная сканирующая микроскопия	789	ретровирусы	624
архитектоника микробного сообщества	737	коронавирусы	617	сепсис	649
бактерионосители	683	лейкоз кошачьих	624	септический шок	649
белок F наружной мембраны (OprF)	763	летальность	707	серебро	771
беременность	635	летальный исход	752	серопревалентность	692
биоопленка	789	летучие мыши	617	системная воспалительная реакция	649
больные	683	«ловушки» вирусов	777	системное воспаление	649
вентиляционные нарушения	671	мель	771	структура микробного сообщества	737
вирус герпеса человека 6 типа	635	микроциркуляция	649	токсигенные штаммы	683
вирус простого герпеса 1 типа	635	микрочастицы из гомополимера полимолочной кислоты	777	трансформация лесов	707
вирус простого герпеса 2 типа	635	морфология	784	туберкулез	671
вирусный гепатит	784	мультилокусное секвенирование	683	фактор индукции SOS-ответа клетки	663
ВИЧ-инфицированные пациенты	737	наночастицы из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля	777	хроническое воспаление низкой интенсивности	649
внутриутробные инфекции	635	наночастицы металлов	771	ширроз	784
врожденные инфекции	635	нарушения активации	745	цитомегаловирус	635
Вьетнам	692	некронефроз	784	цитомегаловирусная инфекция	745
генотоксичность	663	неонатальная смертность	635	щелочная фосфатаза	663
географическое происхождение	701	новорожденные	635, 745	экология	707
гепатит E	692	обилие клещей	707	эпидемиология	707, 723
Глобальная сеть по госпитальному надзору за гриппом	723	общепатологические процессы	649	этиология ОРВИ	723
грибковый кератит	789	опухоль	624	этнические группы	692
грибы <i>Fusarium</i>	789	орофарингеальный кандидоз	737	<i>C. diptheriae</i>	683
грибы рода <i>Candida</i>	737	острые респираторные вирусные инфекции	723	COVID-19	609, 617
грипп	723	отеки	784	<i>Helicobacter pylori</i>	701
гриппоподобные заболевания	723	паравоспаление	649	INDEL	701
дети	635, 752	парвовирус B19	635	MST-дендрограмма	701
дикие и домашние животные	617	печень	784	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	763
дифтерия	683	полирезистентность	771	SARS-CoV-2	609, 617
дифференциальная диагностика	752			SOS-хромотест	663
Европейский Север	707			T-лимфоциты	745
заболеваемость	707			VNTR-типирование	701
зеленый синтез	771				

Иллюстрации к статье «Ассоциация возбудителей инфекционных диарей с летальными исходами у детей дошкольного возраста» (авторы: А.Т. Подколзин, Т.А. Кожухметова, Д.Х. Кясова, З.Х. Далелова, К.В. Кулешов, А.Н. Гусева, А.С. Павлова, О.А. Веселова, Н.В. Паркина, Т.А. Коновалова, С.Б. Яцышина) (с. 752–762)

Illustrations for the article "A relationship between causative agents of infectious diarrhea and fatal outcomes in pre-school children" (authors: Podkolzin A.T., Kozhakhmetova T.A., Kyasova D.Kh., Dalelova Z.Kh., Kuleshov K.V., Guseva A.N., Pavlova A.S., Veselova O.A., Parkina N.V., Konovalova T.A., Yatsyshina S.B.) (pp. 752–762)

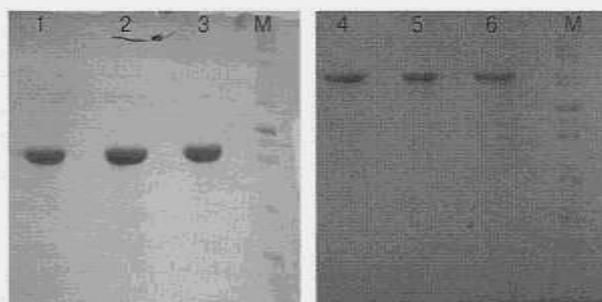


**Рисунок 2. Диаграмма Сэнки — соотношения возраста заболевших, этиологии заболевания и сроков наступления летальных исходов для патогенов с частотой выявления > 1 (71 пациент с установленной этиологией заболевания, РФ 2011–2019 гг.)**

Figure 2. Sankey diagram of the relationship between the age of patients, the etiology of the disease and the timing of deaths assessed for pathogens with a detection rate of > 1 (71 patients with an established etiology of the disease, RF 2011–2019)

**Иллюстрации к статье «Получение, оценка специфической активности и подлинности рекомбинантной вакцины, предназначенной для профилактики синегнойной инфекции» (авторы: А.А. Калошин, Е.М. Зимина, Е.О. Калиниченко, Н.А. Михайлова) (с. 763–770)**

Illustrations for the article "Generation and evaluation of specific activity and authenticity of recombinant vaccine designed preventing against *Pseudomonas aeruginosa*" (authors: Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A.) (pp. 763–770)

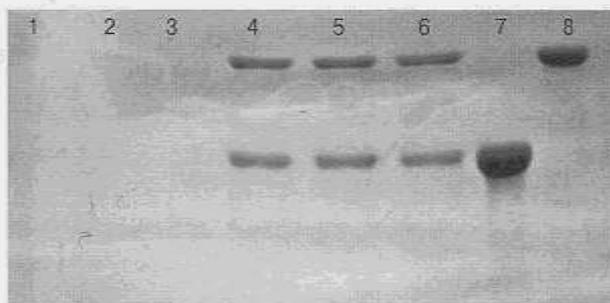


**Рисунок 1. Анализ подлинности рекомбинантных антигенов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Гели, окрашенные Кумасси R-250**

Figure 1. Analysis of the identity of recombinant antigens by polyacrylamide gel electrophoresis. Gels stained by Coomassie R-250

Дорожки: 1, 2, 3 — рекомбинантный белок OprF (серий № 1, 2 и 3); 4, 5, 6 — рекомбинантный анатоксин (серий № 1, 2 и 3); M — весовой белковый маркер Fermentas-SM0661 (200, 150, 120, 85, 70, 60, 50, 40, 30 и 25, 20 и 15 kDa).

Lanes: 1, 2, 3 — recombinant protein OprF (lots No. 1, 2, 3); 4, 5, 6 — recombinant toxoid (lots No. 1, 2, 3); M — molecular-weight marker Fermentas-SM0661 (200, 150, 120, 85, 70, 60, 50, 40, 30 and 25, 20 and 15 kDa).

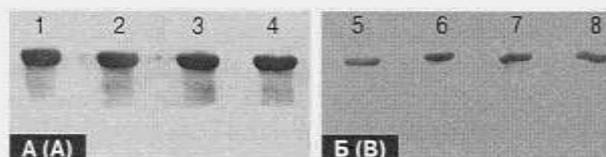


**Рисунок 3. Анализ полноты сорбции и подлинности опытных серий рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Гель, окрашенный Кумасси R-250**

Figure 3. Analysis of the absorption and the authenticity of the experimental lots of recombinant vaccine pseudomonas (RVP) by polyacrylamide gel electrophoresis. Gel stained by Coomassie R-250

Дорожки: 1 — РВС серия № 1; 2 — РВС серия № 2; 3 — РВС серия № 3; 4 — РВС серия № 1 после десорбции; 5 — РВС серия № 2 после десорбции; 6 — РВС серия № 3 после десорбции; 7 — рекомбинантный белок OprF (контроль); 8 — рекомбинантный анатоксин (контроль).

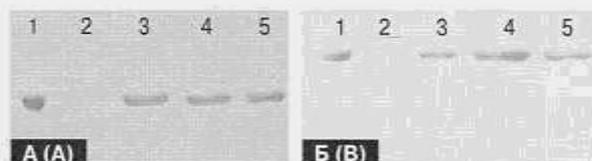
Lanes: 1, 2, 3 — RVP lot No. 1; 2 — RVP lot No. 2; 3 — RVP lot No. 3; 4 — RVP lot No. 1 after desorption; 5 — RVP lot No. 2 after desorption; 6 — RVP lot No. 3 after desorption; 7 — recombinant protein OprF (referent-preparation); 8 — recombinant toxoid (referent-preparation).



**Рисунок 2. Анализ подлинности рекомбинантных антигенов в иммуноблоттинге**  
Figure 2. Analysis of the authenticity of recombinant antigens by immunoblotting

A — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному белку OprF; B — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному анатоксину. Дорожки: 1, 2, 3 — рекомбинантный белок OprF (серий № 1, 2 и 3); 8 — контрольный препарат рекомбинантного белка OprF; 5, 6, 7 — рекомбинантный анатоксин (серий № 1, 2 и 3); 8 — контрольный препарат рекомбинантного анатоксина.

A — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant protein OprF; B — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant toxoid. Lanes: 1, 2, 3 — recombinant protein OprF (lots No. 1, 2, 3); 8 — referent-preparation of recombinant protein OprF; 5, 6, 7 — recombinant toxoid (lots No. 1, 2, 3); 8 — referent-preparation of recombinant toxoid.



**Рисунок 4. Анализ подлинности опытных серий рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС) в иммуноблоттинге**

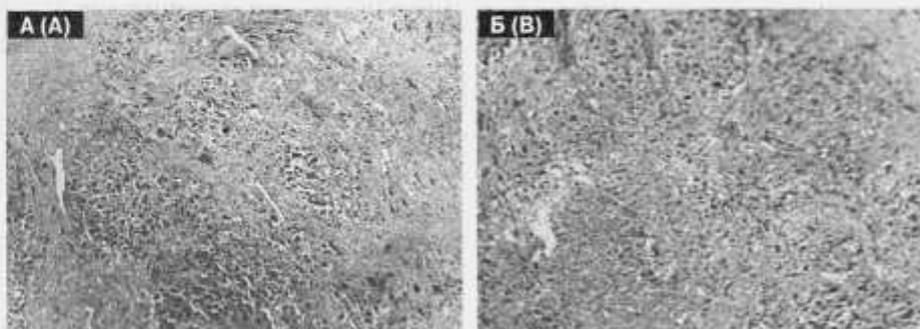
Figure 4. Analysis of the authenticity of the experimental lots of recombinant vaccine pseudomonas (RVP) by immunoblotting

A — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному белку OprF; B — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному анатоксину. Дорожки: 1 — рекомбинантный белок OprF (контроль); 2 — рекомбинантный анатоксин (контроль); 3 — РВС серия № 1; 4 — РВС серия № 2; 5 — РВС серия № 3.

A — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant protein OprF; B — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant toxoid. Lanes: 1 — recombinant protein OprF (referent-preparation); 2 — recombinant toxoid (referent-preparation); 3 — RVP lot No. 1; 4 — RVP lot No. 2; 5 — RVP lot No. 3.

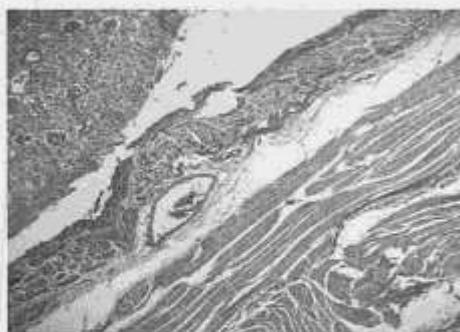
**Иллюстрации к статье «Клинико-морфологический случай развития цирроза печени, ассоциированного с вирусным гепатитом, у молодого пациента» (авторы: О.В. Воробьева, А.В. Ласточкин) (с. 784–788)**

Illustrations for the article "Clinical and morphological case of developing liver cirrhosis associated with viral hepatitis in a young patient" (authors: Vorobeva O.V., Lastochkin A.V.) (pp. 784–788)



**Рисунок 1. Нарушение гистоархитектоники печеночных долек с развитием фиброза портальных трактов с лимфогистиоцитарной инфильтрацией**

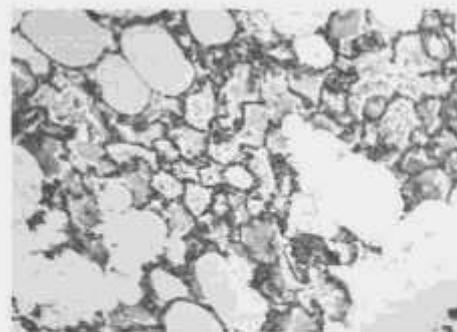
Figure 1. Altered histological architectonics of the hepatic lobules with signs of developing portal tract fibrosis and lymphohistiocytic infiltration



**Рисунок 2. Расширенные вены нижней трети пищевода**

Figure 2. Dilated veins of the lower third of the esophagus

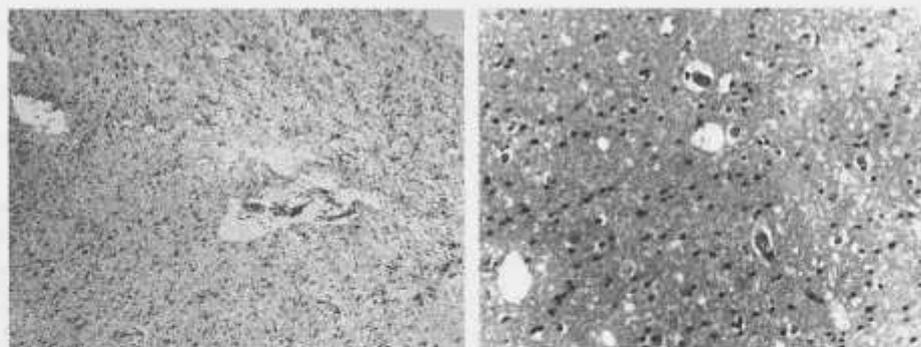
**Примечание.** Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ .  
Note. Stained with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 400$ .



**Рисунок 3. Отечная жидкость в альвеолах, участки кровенаполнения**

Figure 3. Alveolar transudate, foci of blood filling

**Примечание.** Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ .  
Note. Stained with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 400$ .



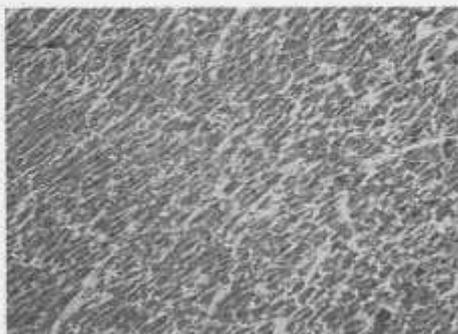
**Рисунок 4. Отек головного мозга с периваскулярными лимфоцитарными инфильтратами, дистрофические изменения в нейронах и участки демиелинизации**

Figure 4. Cerebral edema with perivascular lymphocytic infiltrates, dystrophic changes in neuronal cells and demyelination foci

**Примечание.** Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ ,  $\times 900$ .  
Note. Stained with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 400$ ,  $\times 900$ .

**Иллюстрации к статье «Клинико-морфологический случай развития цирроза печени, ассоциированного с вирусным гепатитом, у молодого пациента» (авторы: О.В. Воробьева, А.В. Ласточкин) (с. 784–788)**

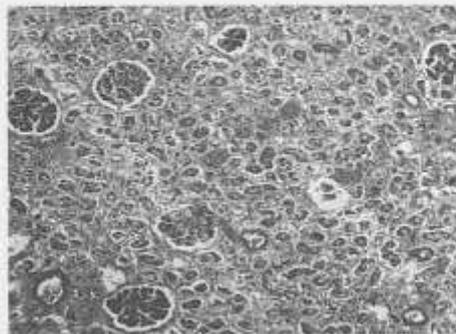
Illustrations for the article "Clinical and morphological case of developing liver cirrhosis associated with viral hepatitis in a young patient" (authors: Vorobeve O.V., Lastochkin A.V.) (pp. 784–788)



**Рисунок 5. Фрагментация гипертрофированных кардиомиоцитов**

Figure 5. Fragmented hypertrophic cardiomyocytes

**Примечание.** Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ .  
Note. Stained with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 400$ .



**Рисунок 6. Острая почечная недостаточность**  
Figure 6. Acute renal failure

**Примечание.** Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ .  
Note. Stained with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 400$ .

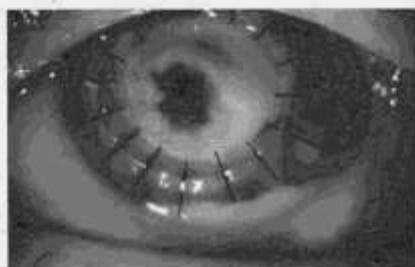
**Иллюстрации к статье «Особенности антифунгальной терапии при длительном инфекционном процессе: клинический случай грибкового кератита и анализ профиля противогрибковой чувствительности с учетом формирования биопленок» (авторы: Р.И. Валиева, С.А. Лисовская, К.А. Маянская, Д.В. Самигуллин, Г.Ш. Исаева) (с. 789–796)**

Illustrations for the article "Features of antifungal therapy during long-lasting infectious process: a clinical case of fungal keratitis and profile of antifungal sensitivity based on assessing biofilm formation" (authors: Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G.Sh.) (pp. 789–796)



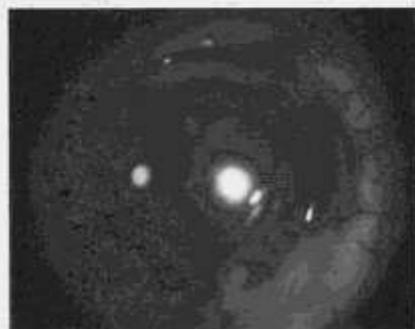
**Рисунок 1. Первичные проявления заболевания. Наблюдаются симптомы переднего увеита в виде гипопиона. Микроскопия щелевой лампой HS-5000**

Figure 1. Primary disease manifestations. Symptoms of anterior uveitis in the form of hypopyon are observed. HS-5000 Slit Lamp Microscopy



**Рисунок 2. Состояние спустя неделю после первой глубокой послойной кератопластики. Скопление гноя и выпадение фибрина в передней камере глазного яблока, начало вторичной инфильтрации на границе «донор–реципиент». Микроскопия щелевой лампой HS-5000**

Figure 2. A state of fungal keratitis one week after conducting the first deep layer keratoplasty. Pus accumulation and loss of fibrin in the anterior chamber of the eyeball, onset of the secondary infiltration at the "donor–recipient" border. HS-5000 Slit Lamp Microscopy

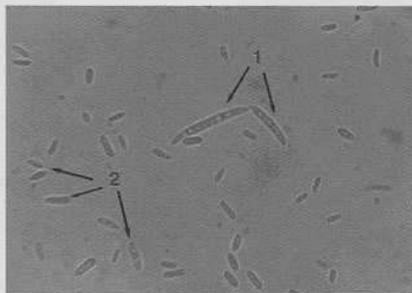


**Рисунок 3. Состояние спустя более 9 месяцев после пересадки роговично-склерального диска. Отсутствуют признаки отторжения трансплантата, полная эпителизация трансплантата. Микроскопия щелевой лампой HS-5000**

Figure 3. A state of fungal keratitis more than 9 months after conducting transplantation of the corneal scleral disk. No signs of transplant rejection are observed, with full transplant epithelization. HS-5000 Slit Lamp Microscopy

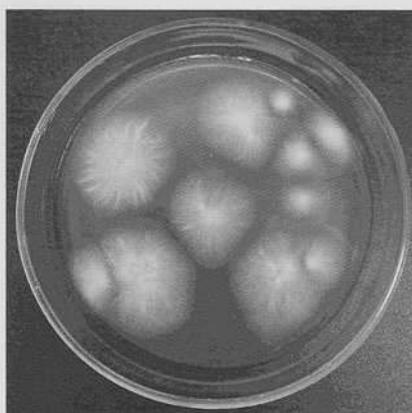
**Иллюстрации к статье «Особенности антифунгальной терапии при длительном инфекционном процессе: клинический случай грибкового кератита и анализ профиля противогрибковой чувствительности с учетом формирования биопленок» (авторы: Р.И. Валиева, С.А. Лисовская, К.А. Маянская, Д.В. Самигуллин, Г.Ш. Исаева) (с. 789–796)**

Illustrations for the article "Features of antifungal therapy during long-lasting infectious process: a clinical case of fungal keratitis and profile of antifungal sensitivity based on assessing biofilm formation" (authors: Valieva R.I., Lisovskaya S.A., Mayanskaya K.A., Samigullin D.V., Isaeva G.Sh.) (pp. 789–796)



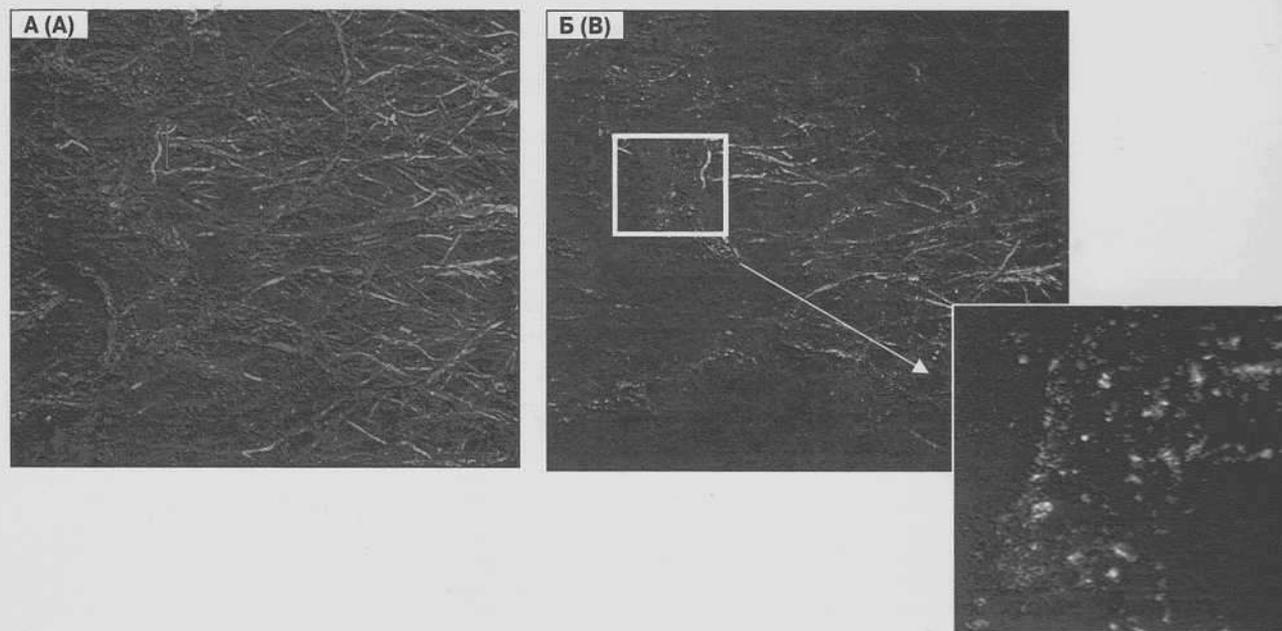
**Рисунок 4. Содержимое передней камеры глаза пациента. Обнаружены изогнутые тонкостенные макроконидии (1) и многочленные булавовидные микроконидии (2) с поперечными перегородками и зернистой поверхностью. Нативный препарат, увеличение 20×40**

Figure 4. Contents of the patient eye anterior chamber. Thin-walled curved macroconidia (1) and multiple oval microconidia (2) with transverse septa and a granular surface were found. Native sample, magnification 20×40



**Рисунок 5. Клинический штамм *F. solani*, выращенный на модифицированной среде Сабуро при температуре +30°C в течение 3 суток. Колонии хлопьевидные, обильный воздушный мицелий белого цвета; кремовая пигментация реверса**

Figure 5. *F. solani* clinical strain grown on a modified Saburo medium, at +30°C, for 3 days. Flaky colonies, abundant air mycelium of white color; cream pigmentation of the reverse are observed



**Рисунок 6. Архитектура 5-дневной биопленки клинического штамма *F. solani***

Figure 6. Architecture of a 5-day biofilm for a *F. solani* clinical strain

A — контроль, рост биопленки на среде Сабуро без добавления антимикробных препаратов; Б — после воздействия вориконазола в концентрации 400 мкг/мл. Стрелкой показаны жизнеспособные ядра. Окрашивание красителями PI (красный флуоресцентный) и АО (зеленый флуоресцентный). Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия Carl Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

A — control, biofilm growth on Saburo medium added with no antimicrobial agents; B — after exposure to voriconazole at a concentration of 400 µg/ml. The arrow indicates at viable nuclei. Stained with PI (red fluorescent) and AO (green fluorescent). Confocal laser scanning microscopy Carl Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Germany).

**Подписной индекс:**  
Роспечать – 95001  
Пресса России – 41392

ISSN 2220-7619



9 772220 761900