ISSN Print 2070–7320
ISSN Online 2070–7339

ВЕСТНИК РГМУ

01 / 2017 ЯНВАРЬ-ФЕВРАЛЬ
VESTNIKRGMU.RU

ЭВОЛЮЦИЯ ИНФЕКЦИЙ ОБЗОР

СТАТЬЯ **Штаммы *Staphylococcus epidermidis*** 26
Результаты анализа генетического полиморфизма штаммов, выделенных у новорожденных

СТАТЬЯ **Терапия туберкулеза с МЛУ** 48
Описаны соединения классов аминопиридинов и аминопиримидинов — кандидаты в препараты

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ ВЫПУСКА

Павел Назаров, к. б. н.
старший научный сотрудник НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ

Елена Эсауленко, д. м. н.
заведующая лабораторией вирусных гепатитов Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

РЕДАКТОРЫ Елена Куликова, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк, Энтони Нвохири

РУКОВОДИТЕЛЬ РЕДАКЦИИ Елена Куликова

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М. Р. Богомильский, член-корр. РАН, д. м. н, профессор. (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Росия)
В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Иванов, к. м. н. (Москва, Россия)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)
В. В. Негребецкий, д. х. н, профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ДЛЯ ПОДАЧИ РУКОПИСЕЙ editor@vestnikrgmu.ru
ДЛЯ СОТРУДНИЧЕСТВА manager@vestnikrgmu.ru
АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в РИНЦ. IF 2014: 0,139

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Индекс Хирша (h^5) журнала по оценке Google Scholar: 3

Здесь находится открытый архив журнала

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.
Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org

Подписано в печать 28.02.2017
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc
DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc
GUEST EDITORS
Pavel Nazarov, CSc (biology)
Senior Researcher in A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU (Moscow, Russia)
Elena Esaulenko, DSc (medicine)
Head of Laboratory of Viral Hepatitis in Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint-Patersburg, Russia)
EDITORS Elena Kulikova, Liliya Egorova
PROOF-READER Olga Komar
TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk, Anthony Nwohiri
EDITORIAL MANAGER Elena Kulikova

EDITORIAL BOARD

Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ivanov AA, CSc (Moscow, Russia)
Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)
Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)
Takhchidi KhP, corr.member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, Dsc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

FOR PAPERS SUBMISSION editor@vestnikrgmu.ru
FOR COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru
ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

The journal is included in RSCI. IF 2014: 0,139

The journal is included in the list of HAC 27.01.2016 (no. 1760)

Five-year h-index is 3

Free access archive of the journal is here

The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994
Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)
The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org

Approved for print 28.02.2017
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ВЕСТНИК РГМУ 1, 2017
BULLETIN OF RSMU

Содержание
Contents

ОБЗОР 5

Возникновение новых инфекций в XXI веке и способы их идентификации с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS)
В. В. Макаров, А. В. Хромов, В. А. Гущин, А. П. Ткачук

Emergence of new infections in the 21st century and identification of pathogens using next generation sequencing
Makarov VV , Khromov AV, Guschin VA, Tkachuk AP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 26

Генетический полиморфизм госпитальных штаммов *Staphylococcus epidermidis,* выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии
А. Б. Гордеев, Л. А. Любасовская, Ю. В. Родченко, Д. В. Дубоделов, И. С. Мукосей, Т. О. Кочеткова, И. В. Никитина, О. В. Ионов, В. В. Зубков, Д. Ю. Трофимов, Т. В. Припутневич

Genetic polymorphism of *Staphylococcus epidermidis* strains in patients of the Neonatal Intensive Care Unit
Gordeev AB, Lyubasovskaya LA, Rodchenko JV, Dubodelov DV, Mukosey IS, Kochetkova TO, Nikitina IV, Ionov OV, Zubkov VV, Trofimov DY, Priputnevich TV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 34

Полиморфизм гена *dtxR* у современных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*
И. А. Чагина, Ю. С. Переварова, В. В. Переваров, А. В. Чаплин, О. Ю. Борисова, Л. И. Кафарская, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин

Polymorphism of the *dtxR* gene in the currently existing strains of *Corynebacterium diphtheriae*
Chagina IA, Perevarova YuS, Perevarov VV, Chaplin AV, Borisova OYu, Kafarskaia LI, Afanas'ev SS, Aleshkin VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 42

Ингибиторы серин-треониновых протеинкиназ классов аминопиридинов и аминопиримидинов — кандидаты в препараты для лечения лекарственно-устойчивых форм туберкулеза
Д. А. Маслов, О. Б. Беккер, М. Г. Алексеева, Л. М. Князева, Д. А. Мавлетова, И. И. Афанасьев, Н. И. Василевич, В. Н. Даниленко

Aminopyridine- and aminopyrimidine-based serine/threonine protein kinase inhibitors are drug candidates for treating drug-resistant tuberculosis
Maslov DA, Bekker OB, Alekseeva MG, Kniazeva LM, Mavletova DA, Afanasyev II, Vasilevich NI, Danilenko VN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 48

Генотипирование клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в Московском регионе, методом MIRU-VNTR
К. В. Шур, Д. А. Маслов, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко

MIRU-VNTR genotyping of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Moscow region
Shur KV, Maslov DA, Bekker OB, Danilenko VN

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ 52

Ведение беременной пациентки с ВИЧ-инфекцией и множественными вторичными заболеваниями на фоне выраженного иммунодефицита
О. А. Чернявская

Management of the HIV-positive pregnant patient with marked immunodeficiency and multiple comorbidities
Chernyavskaya OA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 59

Клинико-иммунологические и вирусологические показатели эффективности антиретровирусной терапии
А. Ф. Олейник, В. Х. Фазылов, А. Т. Бешимов

Clinical, immunological and virological indicators of antiretroviral therapy efficiency
Oleynik AF, Fazylov VH, Beshimov AT

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 66

Выявление оккультного гепатита В при тестировании донорской крови
Ж. Г. Еремеева, В. Х. Фазылов

Detecting occult hepatitis B when testing donated blood
Eremeeva ZhG, Fazylov VH

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 70

Лечение ран экстрактом из листьев трансгенного каланхоэ с цекропином Р1 (гистологическое исследование)
А. С. Белоус, А. Б. Шевелев, Е. В. Трубникова, Ю. К. Бирюкова, Е. С. Мишина, Е. А. Лойко, А. А. Лебедева, Н. С. Захарченко

Wound care with the leaf extract of cecropin P1-producing transgenic kalanchoe: histological findings
Belous AS, Shevelev AB, Trubnikova EV, Biryukova YuK, Mishina ES, Loyko EA, Lebedeva AA, Zakharchenko NS

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 79

Ключевые показатели результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения за 2011–2015 гг.
А. С. Анискевич, Р. А. Хальфин

Key performance indicators for healthcare research organizations between 2011 and 2015
Aniskevich AS, Halfin RA

ВОЗНИКНОВЕНИЕ НОВЫХ ИНФЕКЦИЙ В XXI ВЕКЕ И СПОСОБЫ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (NGS)

В. В. Макаров[1]✉, А. В. Хромов[2], В. А. Гущин[1,3], А. П. Ткачук[3]

[1] Отдел физических методов измерения, НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[2] Факультет биоинформатики и биоинженерии, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[3] Лаборатория трансляционной биомедицины, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

Каждое новое инфекционное заболевание может быть серьезным вызовом для современной медицины. Изменение окружающей среды, вырубка тропических лесов, таяние льдов в Антарктике, увеличение плотности населения и повсеместное использование антибиотиков — все это факторы, провоцирующие появление новых патогенов. Эпидемии гриппа, вызываемые новыми штаммами вируса; респираторные синдромы, вызываемые новыми коронавирусами; вспышки инфекций, причиной которых является гемолитическая кишечная палочка; возникновение резистентных к антибиотикам супербактерий — примеры того, какие опасности могут поджидать человечество. В число первоочередных мер, которые необходимо предпринять для противодействия новым патогенам, входит разработка способов их быстрой и точной идентификации. В обзоре рассмотрены случаи возникновения в XXI веке новых инфекционных агентов, а также проанализированы возможность и перспективы использования для выявления и идентификации новых патогенов методов высокопроизводительного секвенирования (next generation sequence).

Ключевые слова: инфекционные агенты, патогенные организмы, методы выявления новых патогенов, высокопроизводительное секвенирование, коронавирус, вирус гриппа, горизонтальный перенос генов, антибиотикорезистентность

Финансирование: работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 15–54–04004.

✉ **Для корреспонденции:** Макаров Валентин Владимирович
ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 40, г. Москва, 119991; makarovvalentine@gmail.com

Статья получена: 03.02.2017 **Статья принята к печати:** 08.02.2017

EMERGENCE OF NEW INFECTIONS IN THE 21ST CENTURY AND IDENTIFICATION OF PATHOGENS USING NEXT GENERATION SEQUENCING

Makarov VV[1]✉, Khromov AV[2], Guschin VA[1,3], Tkachuk AP[3]

[1] Department of Physical Measurement Methods, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[2] The Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[3] Translational Biomedicine Laboratory, N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Each new emerging infection may become a big challenge to the medical community. Changing environment, tropical deforestation, melting of the Antarctic ice, growing population density and uncontrolled use of antibiotics provoke emergence and evolution of pathogens. Epidemics caused by new strains of the influenza virus, respiratory syndromes associated with coronaviruses, outbreaks of hemolytic *Escherichia coli* infections and antibiotic-resistant superbacteria are hazards to humans. Among high-priority measures for pathogen control that are yet to be taken is development of fast and accurate techniques for pathogen identification. Our review looks at the cases of new infections registered in the 21st century and explores feasibility of next generation sequencing for the detection and identification of new pathogens.

Keywords: infectious agents, pathogens, techniques for identification of new pathogens, next generation sequencing, coronavirus, influenza virus, horizontal gene transfer, resistance to antibiotics

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant no. 15–54–04004.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentin Makarov
ul. Leninskie gory, d. 1., str. 40, Moscow, Russia, 119991; makarovvalentine@gmail.com

Received: 03.02.2017 **Accepted:** 08.02.2017

Вспышки инфекционных заболеваний представляют собой постоянную угрозу для глобального здравоохранения. Обнаружению и изучению новых возбудителей уделяют много внимания, примеры — коронавирус ближневосточного респираторного синдрома, вирус Эбола в Заире или вирус Зики в Южной Америке. Факторы, влияющие на появление новых патогенов, приведены в таблице. Тем не менее значительно чаще эпидемии вызывают известные патогены, такие как полиовирус, грипп или холерный вибрион.

Факторы риска, повышающие вероятность возникновения новых заболеваний

Факторы, связанные с патогеном
Накопление мутаций в геноме
Горизонтальный перенос генов
Мультипатогенные инфекции
Изменение антигенных детерминант
Факторы, связанные с организмом хозяина
Восприимчивость к инфекциям
Наличие путей международных сообщений
Увеличение плотности популяции
Некоторые религиозные и национальные традиции
Биотерроризм
Факторы, связанные с окружающей средой
Изменения экологической обстановки
Развитие промышленности
Климатические изменения
Ошибки системы здравоохранения
Эпидемии у животных
Войны и голод

Большинство эпидемий возникает из-за внешних, климатологических или географических, факторов. Однако иногда их причиной становится антропогенное воздействие. К примеру, некоторые из зоонозов переходят к человеку, потому что исчезают места обитания их природных резервуаров — животных-хозяев. Вырубка лесов в горных районах может привести к наводнениям и затоплению населенных пунктов, что косвенно приводит к вспышкам холеры и других инфекционных заболеваний. Отдельной категорией таких «антропогенных» эпидемий являются целенаправленные манипуляции с патогенами, к примеру, утечка из лабораторий модифицированных биологических агентов, которые либо сами по себе, либо в результате горизонтального переноса генов вирулентности от других биологических объектов могут становиться серьезной биологической угрозой. Механизмы появления новых патогенов приведены на рис. 1.

К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют четкие алгоритмы и готовые коммерческие приложения для идентификации новых патогенных организмов, поэтому в случае их возникновения задачи идентификации и определения характеристик патогена приходится решать с помощью индивидуальных лабораторных подходов. В обзоре подробно рассматриваются случаи возникновения новых инфицирующих агентов в XXI веке, а также обсуждается возможность разработки унифицированного подхода к выявлению патогенов с использованием новых технологий секвенирования.

Примеры и механизмы появления новых патогенов в XXI веке

Новые коронавирусы

В XXI веке человечество уже столкнулось с появлением как минимум 9 новых патогенов (рис. 2). Так, одним из глобальных вызовов мировой системе здравоохранения

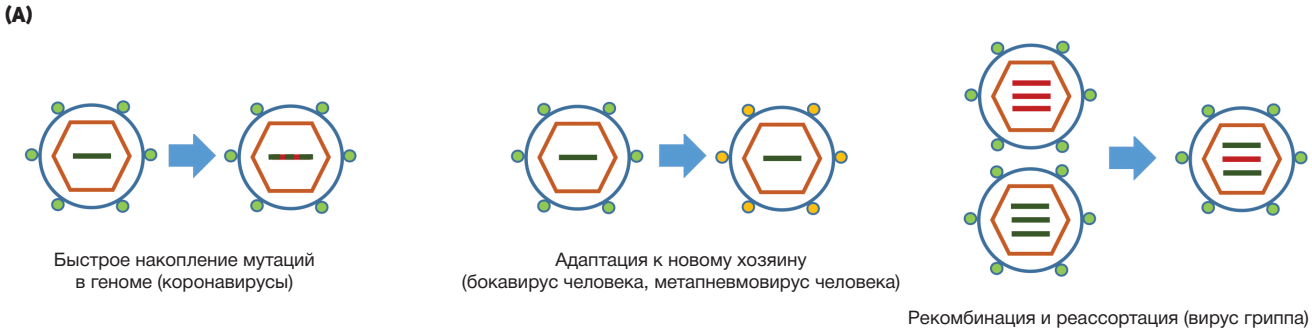


Рис. 1. Генетические механизмы появления новых патогенов среди вирусов **(А)** и бактерий **(Б)**

стало появление в 2002 г. в Китае нового, неизвестного ранее возбудителя атипичной пневмонии. В ноябре 2002 г. в г. Фошан провинции Гуандун скончался фермер, и, хотя диагноз не был точно установлен, стало ясно, что он пал жертвой нового опасного заболевания. Первым этапом признания начала эпидемии стало 27 ноября 2002 г., когда канадская Глобальная разведывательная сеть по здравоохранению (Global Public Health Intelligence Network), являющаяся частью Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), выпустила оповещение о начале серьезной эпидемии в Китае. Затем ВОЗ, после того как получила результаты расследования о вспышке заболевания, запросила информацию у китайских властей. Но об эпидемии стало по-настоящему широко известно только после выхода заболевания за пределы Китая: в феврале 2003 г. в госпитале Ханоя скоропостижно скончался американский бизнесмен, заразившийся пневмонией в Китае. Скорость, с которой новое заболевание вызвало его смерть, поразила общественность. К 15 марта заболевание было названо тяжелым острым респираторным синдромом (ТОРС) [1–3], а к 27 марта возбудитель был идентифицирован как совершенно новый коронавирус и был назван коронавирусом ТОРС [4–6]. С ноября 2002 г. по июль 2003 г. ТОРС перенесли в общей сложности 8 098 пациентов в 25 странах, и 774 случая закончились смертью больных. В определенных популяциях [7] и возрастных группах [8] смертность была очень высокой и могла достигать 40–55 % от числа заболевших. Дальнейшие локальные вспышки заболевания были зарегистрированы в конце 2003 г. и начале 2004 г. в Сингапуре, Тайване, Пекине и Гуанчжоу в результате случайных лабораторных утечек и передачи вируса от животных к человеку [9]. Эти случаи были напрямую связаны с отменой запрета на разделку пальмовых куниц на рынках и в ресторанах, который был введен на время вспышки атипичной пневмонии [10].

Специфичные противовирусные агенты не были доступны во время борьбы со вспышкой ТОРС [11], и основными средствами являлись поддерживающая терапия и антибиотики для противодействия вторичной бактериальной инфекции [12]. При этом эпидемия атипичной пневмонии была локализована в первую очередь благодаря высокоэффективным мерам глобального общественного здравоохранения [13], среди которых были отслеживание контактов и карантин лиц с подозрением на инфекцию и зараженных пациентов [14]. В настоящий момент коронавирус ТОРС больше не циркулирует в человеческой популяции, но обнаружение природных резервуаров коронавирусов, предковых по отношению к короновирусу ТОРС, (летучие мыши и другие млекопитающие) свидетельствует о потенциальной угрозе повторного возникновения эпидемии [15].

Детекция нового вируса на тот момент была нетривиальной задачей, однако ученые успешно с ней справились. Клинические образцы от пациентов с ТОРС изучали с использованием клеточных культур и молекулярных методов. Вирус был выделен в культуре клеток, затем с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со случайными (рандомными) праймерами была определена РНК вируса длиной до 300 нуклеотидов. Генетические характеристики вируса показали, что он лишь отдаленно родствен известным

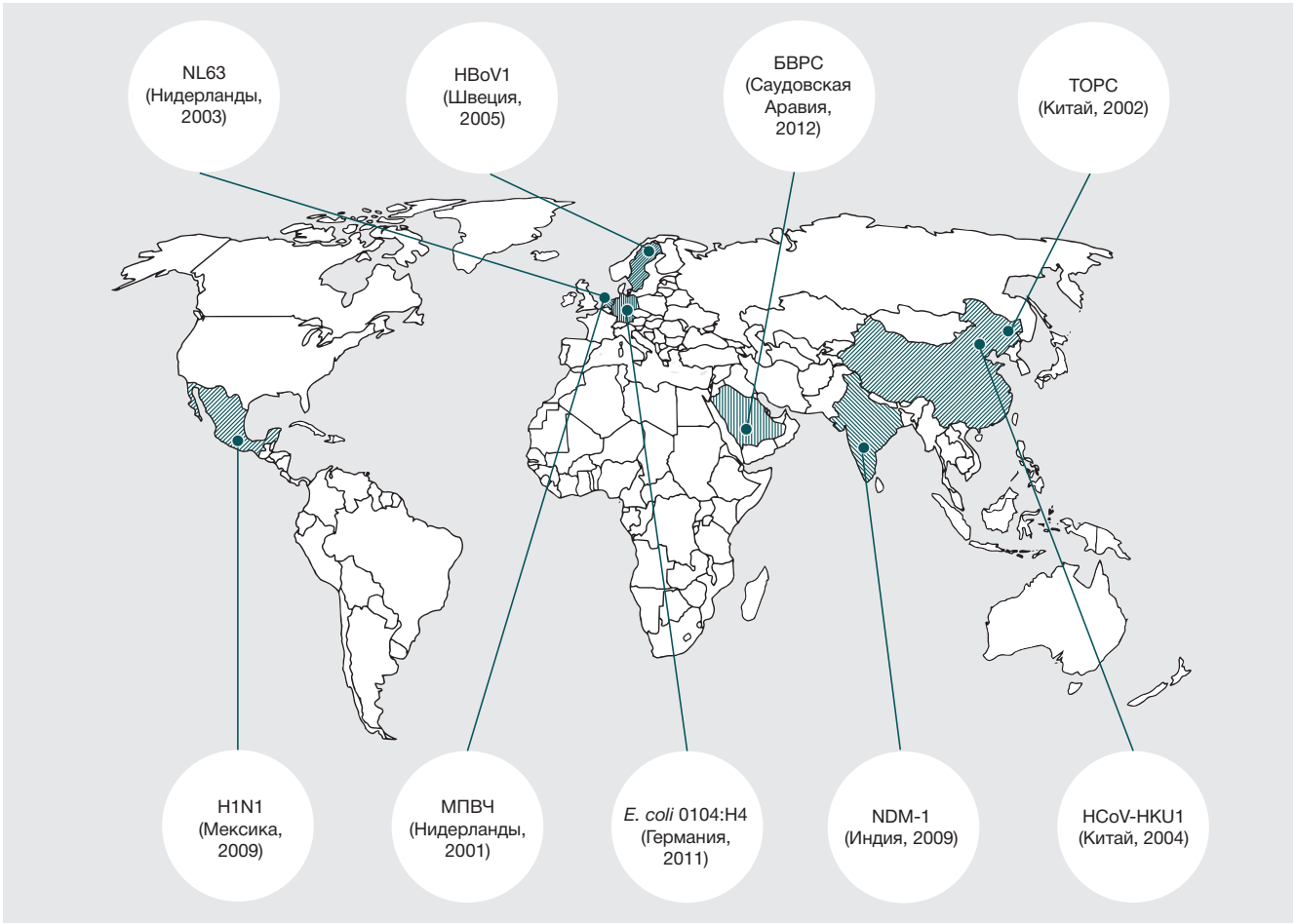


Рис. 2. Карта возникновения новых патогенов в XXI веке

коронавирусам (сходство нуклеотидных последовательностей составило от 50 до 60 %). На основании идентифицированных последовательностей были созданы наборы для специфической высокочувствительной детекции нового вируса с помощью ПЦР и ПЦР в «реальном времени» (ПЦР-РВ). Вирус обнаруживался в различных клинических образцах от пациентов с ТОРС, но не в образцах контрольной группы. Высокие концентрации вирусной РНК (до 100 млн молекул на 1 мл) были найдены в мокроте зараженных пациентов. В чрезвычайно низких концентрациях РНК вируса была также обнаружена в плазме крови пациентов с острой фазой заболевания и в кале в конце выздоровления [4]. Несмотря на то, что эпидемия ТОРС была успешно остановлена, этот коронавирус был не единственным представляющим определенную опасность для населения Земли коронавирусом, открытым в XXI веке.

В 2003 г. 7-месячный ребенок, госпитализированный с обструктивным бронхитом и конъюнктивитом, был обследован на присутствие в организме нескольких респираторных вирусов с целью выявления возбудителя, однако все методы диагностики дали отрицательные результаты. Группа исследователей во главе с Лией ван дер Хук использовала модифицированный метод определения вирусов, основанный на анализе полиморфизмов длин фрагментов рестрикции вирусной кДНК (Virus-Discovery-cDNA-AFLP, VIDISCA). Данный метод основан на ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) вирусной РНК с последующим ограниченнным расщеплением кДНК с помощью частощепящих рестриктаз. Результаты показали определенное сходство обнаруженных последовательностей с последовательностями известных коронавирусов, тем не менее различия были достаточными, чтобы указать на открытие нового вида коронавируса, позднее названного коронавирусом человека NL63 [16].

71-летний пациент из Китая попал в больницу с пневмонией в январе 2004 г. Попытки размножить вирус в культуре клеток, ОТ-ПЦР и прямое обнаружение антигена из аспирата носоглотки указали на отсутствие в организме больного известных респираторных вирусов. ОТ-ПЦР на консервативную область гена полимеразы коронавирусов подтвердила наличие коронавируса, однако попытки культивирования возбудителя были безуспешными. Частичное секвенирование генома коронавируса показало высокую гомологичность его последовательности последовательностям других вирусов рода βCoV, включая HCoV-OC43, но она имела иное происхождение. Этот коронавирус человека, названный HCoV-HKU1, через некоторое время удалось выделить из аспирата другой пациентки [17]. Позднее также вирус удалось воспроизвести в культуре клеток реснитчатого эпителия дыхательных путей человека, однако его культивирование по-прежнему остается сложной задачей. С момента открытия HCoV-HKU1 удалось показать, что этот вирус распространен глобально, а ретроспективный анализ хранящихся назофарингеальных препаратов подтвердил его существование по крайней мере с 1995 г. [18].

В июне 2012 г. мир узнал о появлении совершенно нового штамма коронавируса человека. Образец мокроты был отобран у 60-летнего мужчины с тяжелым респираторным заболеванием доктором Сулейманом Факихом в больнице в Джидде (Саудовская Аравия). Анализы на распространенные вирусные респираторные инфекции не позволили выявить биологический агент, вызвавший заболевание. Образец мокроты был отправлен в Роттердам (Нидерланды), где вирус был идентифицирован как новый коронавирус, условно названный HCoV-EMC (человеческий коронавирус из Erasmus Medical College). Пациент позднее умер вследствие острой пневмонии и последующей почечной недостаточности [19]. С момента открытия этого патогена были определены и описаны в научной литературе несколько новых изолятов, в разных базах данных и СМИ — под разными названиями. Для изучения вируса была организована научная группа из вирусологов, занимающихся коронавирусами. Для того чтобы избежать путаницы в исследованиях для нового вируса было выбрано название «коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС)», которое было согласовано первооткрывателями вируса, ВОЗ и Министерством здравоохранения Саудовской Аравии [19].

С июня 2012 г. и до 7 февраля 2014 г. были зарегистрированы 182 случая заболевания БВРС, из которых 79 закончились смертельным исходом. По данным ВОЗ на 11 июня 2014 г., вирус вызвал 699 лабораторно подтвержденных случаев болезни, из которых 209 закончились смертью пациентов [20]. Статистика показывает, что в течение 4 месяцев число случаев заболевания увеличилось более чем в 3 раза, т. е. эпидемия далека от своего завершения. Летальность, составляющая до 30 %, значительно выше среди пациентов с сопутствующими заболеваниями: большое число случаев БВРС зарегистрировано у пациентов с иммунодефицитом или другими основными заболеваниями [21, 22]. Кроме того, существует серьезная угроза внутрибольничной передачи инфекции [23].

Клиническая картина заболевания похожа на симптомы ОРВИ и включает ряд патологических состояний дыхательных путей с такими распространенными симптомами, как кашель, лихорадка и желудочно-кишечные нарушения [24], до начала пневмонии [21]. При БВРС также наблюдались острый респираторный синдром (ОРС), почечная недостаточность, перикардит и диссеминированное внутрисосудистое свертывание [24]. Вероятность пандемической вспышки невелик, т. к. вирус, по всей видимости, неспособен к эффективной передаче от человека к человеку [24] и передается только при устойчивом контакте [25], например, в семьях [26], среди медицинских работников [27] и в результате внутрибольничной передачи [28], особенно если у пациента ослаблен иммунитет.

Происхождение этого вируса пока до конца непонятно. Возможно, произошла первичная передача инфекции от верблюда к человеку.

Таким образом, за последнее десятилетие было открыто 4 новых коронавируса, два из которых являются крайне опасными, в то время как два других были обнаружены почти случайно и практически не выделялись на фоне ОРВИ. Эти данные указывают на то, что появление новых высокопатогенных штаммов — событие весьма вероятное, для которого порой достаточно нескольких нуклеотидных замен в составе генома вируса.

Метапневмовирус человека

В 2001 г. новый вирус был выявлен у 28 пациентов в Нидерландах. Симптомы заболевания, вызванного им, были похожи на симптомы заболевания, вызываемого респираторно-синцитиальным вирусом (РСЧ). Нескольким пациентам потребовалась госпитализация и даже подключение к системе искусственной вентиляции легких. Вирусные изоляты были культивированы в культурах клеток почек человекообразных обезьян (tMK), и цитопатические эффекты, вызванные вирусом, были во многом идентичны

тем, что вызывает РСЧ. Электронная микроскопия супернатанта зараженных клеток выявила парамиксовирусоподобные частицы. Однако результаты ПЦР-РВ с праймерами для детекции известных парамиксовирусов были отрицательными. Тогда для получения информации о последовательности неизвестного вируса использовали ОТ-ПЦР с рандомными праймерами. На основании сходства последовательностей и организации генов заключили, что исследуемый вирус является ближайшим родственником птичьего пневмовируса; его идентифицировали как новый вид рода *Metapneumovirus* — метапневмовирус человека (МПВЧ) [29], и он стал первым вирусом этого рода, способным инфицировать людей. Хотя МПВЧ был обнаружен только в 2001 г., филогенетический анализ показал, что вирус циркулировал в человеческой популяции в течение примерно 50 лет [30, 31]. От 7 до 19 % всех случаев респираторных инфекций у детей (и госпитализированных, и получавших помощь амбулаторно) были обусловлены МПВЧ [32–34]. Как сообщается, этот вирус является вторым по частоте обнаружения среди вирусов, вызывающих инфекции дыхательных путей [35].

Бокавирус человека

Первый бокавирус человека (hBoV) был обнаружен в 2005 г. в назофарингеальном аспирате 282 пациентов с неидентифицированной инфекцией нижних дыхательных путей в Швеции. Исследователи использовали новый метод, который включал этапы обработки образцов ДНКазой, чтобы исключить их загрязнение невирусными нуклеиновыми кислотами, с последующей ОТ-ПЦР с неспецифическими праймерами. Анализ полученных последовательностей с помощью методов биоинформатики выявил присутствие в образцах нового парвовируса, высокогомологичного парвовирусам быков и собак (отсюда название рода — *Bocavirus*). Новый вирус был назван hBoV1 [36]. Три других штамма hBoV были обнаружены в 2010 г. и названы hBoV2, hBoV3 и hBoV4 [37–39].

HBoV1 — это возбудитель респираторных заболеваний, присутствующий во всех регионах планеты и связанный с примерно 19 % всех вирусных инфекций верхних и нижних дыхательных путей [40–42]. HBoV1 эффективно инфицирует культуру эпителиальных клеток дыхательных путей человека и приводит к их цитолизу [43–45]. Эти данные подтверждаются клиническими наблюдениями, указывающими на то, что инфекция действительно проходит в форме респираторного заболевания. Напротив, hBoV2–hBoV4 локализуются в желудочно-кишечном тракте, при этом hBoV2 и, возможно, hBoV3, связаны с гастроэнтеритами [46, 47]. Интересно, что HBoV2 — единственный кишечный бокавирус, изолированный из назофарингеального аспирата, и, следовательно, может также быть связан с респираторными заболеваниями [48, 49]. HBoV1 обнаруживается во всех возрастных группах, но преимущественно среди детей в возрасте от 6–24 мес. [50, 51] и редко — среди взрослых [52–56]. Передача вируса и заражение им происходят в течение всего года, но чаще в зимние и весенние месяцы [55, 57–59].

Вирус гриппа

Другим механизмом появления новых патогенных вирусов является рекомбинация их геномов. Характерным примером служит вирус гриппа (ВГ) человека с сегментированным РНК-геномом, который характеризуется высокой изменчивостью. При заражении несколькими различными штаммами ВГ возможна реассортация геномных РНК этих штаммов и образование новых вариантов ВГ с новыми патогенными свойствами. Постоянные изменения в составе двух поверхностных антигенов (гемагглютинина и нейраминидазы) определяют эпидемиологию вируса гриппа.

Водные птицы являются естественными резервуарами ВГ, в которых, похоже, вирус достиг текущего эволюционного статуса в ходе ряда адаптаций. Отряды гусеобразных и ржанкообразных являются исходными хозяевами ВГ с самым высоким разнообразием штаммов: 17 подтипов по гемаглютинину и 9 подтипов по нейраминидазе [60]. Передача вируса наземным птицам или млекопитающим привела к его быстрой эволюции [61]. Некоторые варианты ВГ циркулируют в человеческих популяциях (H1N1, H3N2), среди свиней (H1N1, H1N2), лошадей (H3N8, H7N7) и собак (H3N8) [62]. Свиньи стали одним из главных резервуаров для возникновения пандемических штаммов ВГ вследствие того, что они имеют рецепторы как для ВГ птиц, так и для ВГ человека (2,3-сиаловые кислоты и 2,6-сиаловые кислоты соответственно) [63, 64]. Свиньи — эффективные «смесительные емкости» для вируса, источник новых реассортантных вариантов, которые обладают смешанными (рекомбинантными) геномами и способны вызвать очередную пандемию [61].

Пандемия — самое страшное проявление вируса гриппа, когда заражены одновременно 20–40 % человеческой популяции по всему миру. Одна из первых документально зафиксированных пандемий вируса гриппа произошла в 1918 г., когда от смертельной «испанки» (штамм H1N1) погибли 25 млн человек [60]. За ней последовали «азиатский грипп» (штамм H2N2) в феврале 1957 г., «гонконгский грипп» (штамм H3N2) в 1968 г., «русский грипп» (штамм H1N1) в 1977 г. и «свиной грипп» (штамм H1N1) в 2009 г. Последний стал первой и пока единственной пандемией XXI века. Штамм H1N1 являлся реассортантом между евразийским вирусом свиного гриппа и североамериканским тройным реассортантом H1N2 [65, 66]. По сравнению со своим зловещим предком он относительно менее вирулентен, но все-таки стал причиной смерти от дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности более 200 и 83 тыс. человек соответственно [67].

С момента идентификации нового штамма вируса птичьего гриппа H7N9 30 марта 2013 г. китайскими властями были зарегистрированы 135 лабораторно подтвержденных случаев инфекции и 45 смертей, данные о которых поступили из Шанхая, Аньхоя, Цзянсу и Чжэцзяня [68]. Единственный случай заболевания за пределами Китая был зафиксирован в Тайване, но и тогда первичное заражение произошло в Китае [69]. Это первые случаи инфицирования людей вариантом H7N9 вируса птичьего гриппа [70, 71]. Ранее нелетальные вирусные инфекции, вызванные штаммами вируса гриппа подгруппы H7 (H7N2, H7N3, H7N5), наблюдались по всей Европе и в США [72]. Исключением стала единственная смерть от штамма H7N7 в Нидерландах в 2003 г. [73, 74]. Интересно, что указанные инфекционные вспышки совпадали со вспышками гриппа у домашней птицы, но для варианта H7N9 такая закономерность отмечена не была. Случаи заражения H7N9 не выглядят эпидемиологически связанными, но возможность передачи инфекции от человека к человеку, по всей видимости, все же существует [75]. Задержки в развитии серологических реакций у лиц, инфицированных штаммом H7N9, осложняют серологическую детекцию вируса [76]. Кроме того, у домашней птицы отмечено латентное

течение заболевания (в отличие от инфекции, вызываемой штаммом H5N1), что существенно затрудняет определение источника и способа передачи патогена и, следовательно, увеличивает риск пандемии.

Кишечная палочка, продуцирующая шига-токсин

Еще одним вариантом возникновения новых патогенных организмов является приобретение хорошо известными организмами новых свойств, таких как продукция токсинов или устойчивость к антибиотикам. Примером результата такой генетической перестройки является эпидемия, которая была вызвана штаммом O104:H4 энтерогемморагической кишечной палочки в 2011 г. в Германии. Это была самая серьезная вспышка инфекции из когда-либо зарегистрированных, вызванных кишечной палочкой, продуцирующей шига-токсин (шига-токсин продуцирующая кишечная палочка, ШПКП): в общей сложности были зафиксированы 3 842 случая инфекции, в том числе 2 987 случаев лабораторно подтвержденного гастроэнтерита (из них — 18 смертей) и 855 случаев гемолитико-уремического синдрома (35 смертей) [77]. Вспышка началась 8 мая, достигла своего пика 22 мая и 4 июля полностью закончилась. Возможно, эпидемию удалось остановить путем предупреждения людей о потреблении ими загрязненных продуктов питания, но также возможно, что зараженные продукты просто перестали поступать на рынки. Были публично раскритикованы запоздалые и вначале ложные заявления о связи инфекции с огурцами и капустой, которые на деле не имели к ней отношения [77]. 10 июня в качестве источника инфекции немецкими властями были объявлены проростки пажитника, импортировавшиеся из Египта [78].

Эпидемиологический анализ инфекции, изначально передающейся через пищу, становится сложнее производить, когда патоген начинает передаваться от человека к человеку. Такой способ инфицирования был отмечен примерно в 20 % домохозяйств с первичным пациентом, инфицированным через пищу хорошо охарактеризованным родственным штаммом энтерогемморагической кишечной палочки O157:H7 [79]. Вторичная передача в быту у взрослых пациентов также была выявлена и для штамма O104:H4 во Франции [80] и Нидерландах [81] за счет наблюдавшейся задержки начала инфекции по сравнению со стандартным временем инкубации (от 7 до 9 дней для O104:H4). Вторичные трансмиссии также были отмечены в Гессене (Германия), который находился за пределами главного очага эпидемии на севере страны [82]. Исследования также документально подтвердили передачу инфекции не только в семьях, но и в больницах и даже в микробиологической лаборатории.

Секвенирование генома штамма O104:H4, обнаруженного в Германии, было выполнено в кратчайшие сроки сразу несколькими группами исследователей. Первая последовательность была получена в Пекинском институте геномики, где изучали образец, переданный исследователями из Университета Гамбурга. Китайские ученые выполнили секвенирование генома бактерии за 3 дня, используя платформу Ion Torrent. Первая аннотированная последовательность генома была опубликована группой из Геттингенского университета. При этом были использованы геномные секвенаторы Flex [83], Ion Torrent [84] и PacBio RS [85]. Важно, что в результате использования комбинированного подхода с применением нескольких технологий высокопроизводительного секвенирования было достигнуто высокое качество сборки (по длине прочтения, по числу ошибок в последовательностях, по числу пропусков и пр.). Картирование последовательностей продемонстрировало сходство полученного штамма с четырьмя другими штаммами энтерогемморагической кишечной палочки, вызвавшими вспышки инфекций, в том числе штаммом энтероагрегативной кишечной палочки (ЭАКП), выделенной в конце 1990-х гг. у проживавших в Центральной Африке пациентов с ВИЧ-инфекцией, которые страдали от постоянной диареи [86]. Однако африканский штамм не содержал профага Stx2 [84]. Mellmann и соавт. предложили схему эволюции штамма O104:H4, согласно которой предковый штамм преобразовался в O104:H4 вследствие удаления и приобретения мобильных ДНК-элементов путем горизонтального переноса [83]: немецкий вариант патогена получил плазмиды, несущие гены одного из типов фимбрий/пилей (AAP/I), и потерял плазмиды, несущие гены фимбрий AAF/III и термостойкого энтеротоксина Aста, а, кроме того, приобрел плазмиду, несущую гены ферментов TEM-1 и CTX-M-15, определяющих устойчивость к антибиотикам. Сравнение эпидемических штаммов между собой также показало наличие крупномасштабных делеций, вставок и инверсий между изолятами, подтвердив, таким образом, существенную геномную мобильность. Исследователи также установили, что именно эти структурно различающиеся регионы содержат участки, кодирующие факторы вирулентности.

Почему штамм O104:H4 отличался крайне высокой вирулентностью? По результатам изучения генома и генов вирулентности оказалось, что у этого штамма необычное сочетание генов вирулентности из штаммов ШПКП (профаг Stx2, длинные полярные фимбрии, устойчивость к теллуритам, система потребления железа) и штаммов ЭАКП (AAF/I, регулятор транскрипции AggR, дисперсин Aap и энтеротоксин шигеллы Set1) [87]. Последние из описанных локализуются в основном на вирулентной плазмиде pAA [83]. Таким образом, в геноме O104:H4 два различных мобильных элемента, профаг Stx2 и плазмида pAA, обеспечивают вирулентность возбудителя, что достаточно необычно. Возможно, именно такое сочетание факторов вирулентности штаммов ШПКП и ЭАКП привело к появлению этого необыкновенно опасного патогена: он вызывает цитотоксическое повреждение эпителия кишечника, облегчающее системную адсорбцию шиго-токсина, что, в свою очередь, может объяснить высокую распространенность случаев гемолитико-уремического синдрома в ходе эпидемии в Германии. Несмотря на наличие в геноме штамма O104:H4 двух генов устойчивости к антибиотикам, эпидемиологическая ситуация, в частности, количество летальных исходов, была менее печальной, чем могла бы быть, если бы вирус обладал мультирезистентностью к более широкому ряду антибиотиков.

Антибиотикорезистентность и супербактерии

Штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) становятся все более распространенными причинами внутрибольничных инфекций, начиная с первых случаев в 1980-х гг. [88]. Многие страны, в том числе и Россия, столкнулись с растущим числом инфекций, устойчивых к лечению традиционными антибиотиками. Следует отметить, что основными очагами развития и распространения инфекций, вызываемых такими патогенами, как метициллин-устойчивый золотистый стафилококк, ванкомицин-

устойчивый энтерококк и многие грамотрицательные бактерии с МЛУ, стали палаты интенсивной терапии [89].

Грамотрицательные бактерии, устойчивые к карбапенемам, являются одной из самых больших проблем. Карбапенемы — предпочитетельные препараты (препараты выбора, drug of choice) при лечении многих инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями [90]. Тем не менее широкое использование карбапенемов способствовало развитию устойчивости к ним среди этих патогенов. Наиболее часто встречающимися микроорганизмами, устойчивыми к карбапенемам, являются синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и энтеробактерии [91].

Синегнойная палочка вызывает тяжелые инвазивные заболевания у пациентов с ослабленным иммунитетом или находящихся в критическом состоянии. Изоляты *P. aeruginosa*, полученные от больных отделений интенсивной терапии, показывали устойчивость к карбапенемам примерно в 28–37 % случаев [92, 93]. *A. baumannii* также является одним из основных возбудителей внутрибольничных инфекций. Изначально этот патоген был воспримчив к имипенему в большинстве медучреждений. Затем его карбапенем-устойчивые штаммы показали быстрый рост во всем мире, и в некоторых отделениях интенсивной терапии в 50–60 % случаев внутрибольничные инфекции, вызванные ими, не поддаются лечению имипенемом [94, 95]. Многие энтеробактерии, широкий спектр бета-лактамаз-продуцирующих кишечных палочек и штаммы *Klebsiella pneumoniae*, устойчивые к карбапенемам, также являются проблемой в отделениях интенсивной терапии, поскольку карбапенемы считаются последним средством для лечения вызываемых ими инфекций [96].

Считается, что основной движущей силой выработки карбапенемовой устойчивости было интенсивное использование цефалоспоринов третьего поколения, азтреонама и имипенема. Появление в XXI веке полностью устойчивых к антибиотикам бактериальных штаммов, так называемых «супербактерий», — это серьезный вызов современной медицине. Новые опасные патогены могут возникать не только за счет приобретения генов устойчивости, но и за счет активации ряда «скрытых» генов устойчивости вследствие всего нескольких значимых нуклеотидных замен в них. Подобные генно-инженерные модификации — обычное явление для микроорганизмов. В этом контексте приобретает значимость изучение бактериального резистома — совокупности всех генов устойчивости микробиологического сообщества — для эффективного выявления и борьбы с патогенами.

Концепция резистома антибиотиков основана на понимании того, что почвенные актинобактерии и многие другие микроорганизмы являются высокопродуктивными производителями антимикробных соединений. Очевидно, что для сохранения жизнеспособности у микроорганизма должны возникать/развиваться не только механизмы защиты от антибиотиков, но и способность продуцировать антибиотики. В результате многие компоненты резистома развились задолго до того, как применение антибиотиков стало клинически значимым и распространенным [97]. Ряд исследований подтвердил это. Метагеномный анализ образцов древней ДНК, собранных из зоны вечной мерзлоты, продемонстрировал присутствие генов устойчивости к бета-лактамным, тетрациклиновым и гликопептидным антибиотикам [98]. Важным открытием явилось то, что, как оказалось, древние гены устойчивости к гликопептидам (vanHAX) филогенетически кластеризуются с современными последовательностями из гликопептид-продуцирующих организмов, а биохимический анализ одного из важнейших продуктов генов устойчивости к гликопептидам — VanA — показал, что его функции и 3D-структура существенно не изменились в течение тысячелетий [99]. В другом исследовании бактерии, собранные в пещерах, изолированных от поверхности в течение более четырех миллионов лет, оказались фенотипически устойчивыми к 14 различным антибиотикам [100]. Генотипирование и биохимические исследования показали, что гены устойчивости присутствуют в микробном пангеноме независимо от селективного давления со стороны человека [100].

Несмотря на то, что самостоятельное и древнее происхождение резистома стало очевидным, современное и довольно мощное селективное давление на его формирование и трансформацию в результате деятельности человека хорошо известно. Протогены устойчивости не формируют устойчивый фенотип, но имеют потенциал превращения в полноценные гены устойчивости в результате мутации и/или изменений в контексте. Мутации фермента, приводящие к переходу его из одного функционального класса в другой, представляются маловероятными, а вот изменение, в том числе расширение спектра субстратной специфичности ферментов при сохранении функции кажется более вероятным. Структурные исследования продемонстрировали эволюционную близость между линкозамидами и аминогликозиднуклеотидилтрансферазами и полимеразами, и это позволяет предположить, что предковые полимеразы являлись протогенами устойчивости, которые в процессе эволюции развились в эти антибиотико-модифицирующие гены [101].

По аналогии выявленные консервативные структурные элементы и биохимические механизмы позволяют предположить, что протеинкиназы и белковые ацетилтрансферазы имеют общих предков с протогенами устойчивости, из которых сформировались гены устойчивости к аминогликозидам [102, 103]. Более того, даже сами гены устойчивости могут быть протогенами устойчивости для других лекарственных препаратов. К примеру, аминогликозид-ацетилтрансфераза acc(60)-Ia-cr обеспечивает также устойчивость к хинолонам [102]. Предковый фермент acc(60)-Ia обеспечивает устойчивость к аминогликозиду канамицину, а мутаций двух аминокислотных остатков в его составе — Trp102Arg и Asp179Tyr — оказалось достаточно для распространения его субстратной специфичности на некоторые хинолоновые антибиотики, например ципрофлоксацин, причем без потери аминогликозид-ацетилтрансферазной активности.

Частота встречаемости протогенов устойчивости в резистоме неизвестна, и для приобретения ими клинической значимости требуются значительные эволюционные события. Однако приведенные выше примеры подчеркивают потенциал ферментов для расширения своего «портфолио» потенциальных субстратов и их возможную значимую роль в возникновении новых генов устойчивости.

Подобно протогенам устойчивости «молчащие» гены устойчивости не способны формировать резистентный фенотип в их текущем структурном состоянии. В отличие от протогенов эти гены могут быть детектированы в резистоме на основании гомологии между их последовательностями и последовательностями известных генов устойчивости. Например, два фенотипически чувствительных к антибиотикам штамма *Citrobacter freundii*, изолированые в эпоху до использования антибиотиков, содержат гены AmpC бета-лактамазы [103]. Мутации, приводящие

к экспрессии AmpC в данных штаммах, сопровождаются клинической устойчивостью к цефалоспоринам расширенного спектра действия. *Salmonella enterica* дикого типа, культивируемая на богатой питательной среде, чувствительна к аминогликозидам стрептомицину и спектиномицину. Однако тот же штамм устойчив при выращивании на минимальной среде при активации гена aadA аминогликозид-аденилтрансферазы [104]. Когда aadA был суперэкспрессирован в индуцибельной плазмиде, минимальная ингибирующая концентрация стрептомицина также существенно увеличилась дозо-зависимым способом. Таким образом, общий уровень экспрессии гена устойчивости, вероятно, имеет решающее значение в процессе формирования устойчивого фенотипа.

Если мутация — это «рабочая лошадка» эволюции, то горизонтальный перенос генов — это «волшебная палочка», способная мгновенно преобразовать неактивный ген устойчивости в функциональный за счет увеличения числа копий гена или же изменения контекста, обеспечивающего экспрессию гена под «сильным» промотором. Однажды попав в состав мобильного элемента, гены устойчивости получают возможность фактически неограниченно распространяться по микробному пангеному, где они могут накапливать дальнейшие мутации, улучшающие функцию и расширяющие спектр возможных субстратов кодируемых ими ферментов, в ответ на селективное давление со стороны окружающей среды.

Чтобы оценить вклад генов, способных к горизонтальному переносу в составе генома патогенов человека, достаточно взглянуть на золотистый стафиллококк: на мобильные элементы приходится 15–20 % его генома, они включают бактериофаги, островки патогенности, плазмиды, транспозоны и стафилококковые кассетные хромосомы [105]. Эти мобильные элементы накопились в геноме возбудителя под селективным давлением, но их источник — бактерии, которые некогда сосуществовали с золотистым стафиллококком. В то время как детали сетевых взаимодействий между патогенными микроорганизмами и комменсалами остаются в значительной степени неясными, становится все более очевидным, что основные резервуары генов резистентности, доступные патогенам, находятся в человеческом микробиоме [106]. Например, функциональные метагеномные библиотеки, полученные из объединенных проб микробиомов кишечника от младенцев, детей и подростков, содержали данные о генах устойчивости к 14 антибиотикам [107]. Более того, все библиотеки содержали данные о генах устойчивости к тетрациклину, триметоприму, триметоприм-сульфаметоксазолу, D-циклосерину, хлорамфениколу и пенициллину, а многие — к аминогликозидам, глицилциклинам и бета-лактамам. Примерно 3 % от общего числа генов резистентности к антибиотикам в данных библиотеках оказались ассоциированы с мобильными элементами, такими как транспозоны или интегроны [108]. Последствия применения антибиотиков для кишечной микрофлоры активно изучаются. К примеру, удалось показать, что использование антибиотиков, особенно метронидазола и бета-лактамов, снижает общее микробное разнообразие в желудочно-кишечном тракте [108]. Подобные события, когда один бактериальный таксон становится преобладающим в микрофлоре кишечника, зачастую связаны с повышенным риском последующей бактериемии [109].

По всей видимости, один из путей получения генов устойчивости кишечной микрофлорой — это горизонтальный перенос генов устойчивости от сельскохозяйственных животных к человеку через микрофлору пищи. Авторы одной из работ обнаружили, что 42 уникальных гена устойчивости были перенесены сельскохозяйственными изолятами микрофлоры в человеческий микробиом, что позволяет предположить, что микрофлора сельскохозяйственных животных, стоки и отходы ферм могут способствовать развитию клинической резистентности патогенов человека [109]. Мобильные элементы, несущие гены устойчивости к антибиотикам, широко распространены в потребляемой нами вместе с продуктами питания микробиоте [109–113] и являются одним из потенциальных источников генов устойчивости для человеческого микробиома. Это связано со слабым контролем за использованием антибиотиков в сельском хозяйстве. Мониторинг на китайских свинофермах [114] показал, что гены устойчивости были весьма распространены в почвах вследствие использования в качестве удобрения навоза от свиней, получавших корм, содержавший антибиотики. В 3 раза больше уникальных генов устойчивости обнаруживали в геномах патогенов в сельскохозяйственных пробах по сравнению с контрольными, в том числе к антибиотикам, важным для медицины: макролидам (mphA и erm), цефалоспоринам (bla-TEM и blaCTX-M), аминогликозидам (aph и aad) и тетрациклину (tet). Количество транспозаз в геномах патогенов из образцов навоза свиней было в 90 000 раз больше по сравнению с контролем, из образцов почвы — в 1 000 раз больше. Численность транспозаз коррелирует с распространением генов устойчивости в микробиоте сельскохозяйственной продукции, в особенности генов устойчивости к тетрациклину.

Таким образом, все механизмы возникновения новых патогенов можно классифицировать отнесением к одной из двух больших групп случаев:

1. перенос ранее существовавшего патогена от одного хозяина к другому, сопровождающийся тяжелым течением заболевания вследствие неадаптированности организма нового хозяина к новому патогену (один из самых распространенных примеров — цитокиновый шторм);

2. появление новых патогенных свойств у уже известного биологического агента, обычно получаемых в ходе горизонтального переноса генов.

Проблемы идентификации новых патогенов существующими аналитическими методами

Для обнаружения и идентификации патогенов был разработан ряд технологий и коммерческих приложений, позволяющих выявлять нуклеиновые кислоты и антигены, входящие в состав патогенов. И хотя утверждается, что многие из них удовлетворяют высоким требованиям по таким параметрам, как минимальная пробоподготовка, скорость анализа, точность и надежность, в реальности лишь немногие из них могут быть широко использованы на практике, в особенности в полевых условиях [115]. Диагностические методы, применяемые для детекции биоугроз, должны обеспечивать своевременное обнаружение и подтверждение биологических факторов риска непосредственно в образце с минимальным уровнем ложноположительных и ложноотрицательных результатов, а также выявлять модифицированные и неизвестные патогены. Устройства для обнаружения биоугроз должны быть портативными, легкими в использовании и способными обнаруживать несколько факторов, а порой — десятки и сотни факторов одновременно [115].

В настоящее время существует несколько методов диагностики, удовлетворяющих большинству из заданных критериев, однако ни один не удовлетворяет всем из них. В отличие от химических детекторов, способных обнаруживать химические вещества в количествах, угрожающих человеческому здоровью, биологические детекторы редко могут обнаруживать микроорганизмы непосредственно в образцах на уровне или ниже уровня риска из-за их низкой чувствительности и необходимости проведения трудоемкой подготовки пробы для анализа. Диагностические системы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, в целом значительно чувствительнее, чем системы, базирующиеся на использовании антител [115]. Так, метод ПЦР позволяет обнаружить в образце одиночные молекулы нуклеиновых кислот микроорганизма за достаточно короткое время [116–118]. Однако этот метод требует тщательной подготовки пробы и не позволяет напрямую обнаруживать токсины и инфекционные агенты, не содержащие нуклеиновых кислот, к примеру прионы [115].

Помимо чувствительности, не менее важной характеристикой диагностических методов является специфичность, поскольку необходимо свести к минимуму фоновые сигналы и устранить ложноположительные результаты в образцах, которые зачастую представляют собой сложную смесь органических и неорганических соединений. При этом «неспецифика» может также возникать в случае наличия в пробах высоких концентраций конкурирующих антигенов или фрагментов ДНК. В случае с методами, основанными на ПЦР, высокая чувствительность может быть их слабым местом вследствие возможной контаминации образца и получения ложноположительного результата из-за ингибирования работы полимеразы различными веществами, включая гуминовые кислоты и гем.

Другим важным требованием к диагностическим методам является их воспроизводимость. На этот параметр может влиять целый ряд факторов, в том числе такие, как стабильность реагентов и различия в условиях анализа. Значение этих факторов может быть уменьшено путем стандартизации условий сбора образцов и их последующего анализа.

Помимо всего вышеперечисленного, диагностические методы должны обеспечивать обнаружение в образцах различных биологических агентов, т. е. предоставлять возможность мультиплексного анализа. Это необходимо потому, что в исследуемых образцах могут одновременно содержаться токсины, бактерии, вирусы и пр. Более того, в некоторых случаях в образцах необходимо определить неизвестные факторы, которые могут быть преднамеренно изменены в результате генетической или антигенной модификации или же представлять собой новые или неизвестные варианты известных микроорганизмов, что делает их обнаружение чрезвычайно трудной задачей. Стоит отметить, что и обычные биологические агенты трудно обнаружить в зараженных образцах. Образцы биоматериала человека (например, кровь и фекалии), а также образцы пищи, воды и даже воздуха могут создавать существенные проблемы для диагностики. К примеру, антикоагулянты, ДНК лейкоцитов и компоненты гема ингибируют ПЦР [115, 119, 120], что приводит к появлению ложноотрицательного результата. Жиры в пищевых продуктах и большое количество сопутствующих бактерий в образцах фекалий могут искажать результаты иммунологических анализов. По этой причине биологические агенты должны быть выделены или очищены из собранных образцов до анализа и идентификации, что увеличивает время анализа и, главное, делает невозможным полевое применение этих технологий.

Важным фактором для биодетекции является тип материала, влияющий на порядок хранения и транспортировки проб. Образцы, полученные из воды и воздуха, должны быть сконцентрированы для предварительного обнаружения целевых молекул. Пробы воздуха должны быть переведены в жидкое состояние, поскольку большинство методов диагностики приспособлены для анализа только жидких образцов. Объем образца, а также время и метод его транспортировки также важны, особенно в случае с живыми организмами. Иногда для оценки возможного риска может потребоваться подтверждение жизнеспособности микроба, и тогда, к примеру, обычные генетические или иммуннологические методы анализа будут неинформативными.

Различные методы обнаружения и идентификации неизвестных патогенных организмов активно разрабатываются в течение многих лет, вкладываются значительные финансовые средства компаний-разработчиков [115]. Одно из перспективных направлений — технологии высокопроизводительного секвенирования.

Высокороизводительное секвенирование: основные принципы

Высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing, NGS) представляет собой группу методов секвенирования, позволяющих в отличие от классического секвенирования по Сэнгеру получать за один запуск прибора большие объемы прочитанной первичной последовательности ДНК за счет параллельного секвенирования большого количества различных фрагментов. Подобная особенность сделала высокопроизводительное секвенирование по-настоящему универсальным методом генетической характеристики живых объектов. В настоящий момент приложения, основанные на методах NGS, активно применяются не только в сфере научных исследований в таких областях, как молекулярная систематика, биоинженерия, клеточная и молекулярная биология, но и в практической деятельности человека: медицинской клинической генетике, криминалистике, селекции и др.

Все модификации NGS можно поделить на две большие группы: первый тип методов основан на секвенировании заранее амплифицированных фрагментов ДНК из пробы, второй тип связан с прочтением первичной последовательности единичных молекул.

Общий принцип методов секвенирования, основанных на предварительной амплификации матриц, приблизительно одинаков независимо от реагентно-аппаратной базы. Он включает стадию получения библиотек, заключающуюся в получении небольших фрагментов ДНК и введении в их состав адаптерных нуклеотидных последовательностей для закрепления на носителе и отжига специфических праймеров для секвенирования; стадию иммобилизации полученных фрагментных библиотек на микросферах или поверхности проточной ячейки с последующей амплификацией с помощью эмульсионной или мостиковой ПЦР соответственно; стадию гибридизации специфических праймеров с адаптерными участками и непосредственно секвенирования. При этом подходе прочтение последовательности всегда связано с достройкой комплементарной цепи, причем достройка может осуществляться либо путем синтеза новой цепи, либо путем лигирования. Достройка цепи сопровождается испусканием сигнала, природа

которого зависит от типа платформы для секвенирования. Сигнал регистрируется прибором, который переводит его в последовательность нуклеотидов.

Пиросеквенирование, или 454-секвенирование, появившееся первым из всех методов NGS, использует для детекции световой сигнал, возникающий при достройке комплементарной цепи ДНК [121–123], в то время как полупроводниковое секвенирование основано на фиксации изменения pH, происходящего вследствие отщепления протона при образовании фосфодиэфирных связей при достройке цепи [124–127]. Третий вариант — это секвенирование путем лигирования, при котором детектируется флуоресцентный сигнал, возникающий в процессе достройки комплементарной цепи в ячейке, через которую пропускают смесь, содержащая лигазу и специальные флуоресцентно меченные нуклеотидные зонды (октамеры) [128]. Наконец, наиболее распространенным вариантом является секвенирование путем синтеза с использованием обратимо терминированных флуоресцентных нуклеозидтрифосфатов. Амплификация проводится внутри проточной пористой ячейки, через которую пропускаются реагенты для синтеза ДНК [129]. В результате амплификации с использованием мостиковой ПЦР внутри каналов ячейки генерируются кластеры копий исходных фрагментов библиотеки, каждый из которых соответствует одному прочтению. Высокая плотность кластеров (до 800–900 тыс. на мм^2) обеспечивает максимально большой объем получаемых данных. Затем полученные кластеры молекул ДНК секвенируются по принципу, сходному с секвенированием по методу Сэнгера [130, 131].

К недостаткам методов высокопроизводительного секвенирования, основанных на предварительной амплификации ДНК-фрагментов, можно отнести: ошибки в гомополимерных участках и местах, где имеются однонуклеотидные полиморфизмы; сложности разрешения в повторах; зависимость точности прочтения от GC-состава фрагментов ДНК и т. д. [132–134]. Поэтому в настоящее время разрабатывают альтернативные методы секвенирования, в частности, мономолекулярное секвенирование.

Одна из технологий мономолекулярного секвенирования основана на пропускании секвенируемого участка ДНК через активный центр ДНК-полимеразы, при этом высокочувствительной CCD-камерой фиксируется сигнал от присоединения флуоресцентно меченного нуклеотида, попадающего в активный центр ДНК-полимеразы в процессе достройки комплементарной цепи. При присоединении нуклеотида флуоресцентная метка отщепляется, и сигнал падает до фонового уровня. Затем в активный центр попадает следующий нуклеотид, и цикл повторяется [135]. Используемая в этой технологии ДНК-полимераза фага φ29 высокопроцессивна, скорость ее работы составляет около 10 нуклеотидов в секунду. Эта технология позволяет прочитывать длинные молекулы ДНК — до 10–20 тыс. п. о. — и имеет целый ряд практических приложений [136–142].

Другим вариантом мономолекулярного секвенирования является секвенирование с использованием мембран с нанопорами: если мембрану, содержащую такие поры, поместить в электрофоретическую ячейку, то одноцепочечные молекулы ДНК могут протягиваться через пору, при этом происходит изменение силы тока, проходящего через мембрану [113]. При таком протягивании в зависимости от типа нуклеотида происходит определенное по амплитуде и продолжительности изменение силы тока, что дает возможность определить, какой именно нуклеотид находится в полости поры именно сейчас. В настоящее время существует только одна коммерческая серия компактных приборов, в которых реализована данная стратегия секвенирования (MinION компании Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Они распространяются в рамках программы раннего доступа [143]. К безусловным преимуществам нанопорового секвенирования относится возможность делать длинные прочтения без покупки дорогостоящего оборудования. В качестве недостатков можно отметить высокую частоту ошибок (12–20 %) [144]. Однако в настоящий момент все больше исследователей признают перспективность нанопорового секвенирования для метагеномных исследований, секвенирования небольших геномов, идентификации вирусных и бактериальных инфекционных агентов. Так, нанопоровое секвенирование успешно применяется для быстрой диагностики вирусных инфекций, таких как лихорадка Эбола или Чикунгунья, метагеномного изучения бактериального резистома и даже прочтения полных, больших по объему, геномов [145–147].

Основные стратегии идентификации патогенов с использованием NGS

Основными группами патогенов, представляющих наибольшую опасность для человека, являются бактерии и вирусы. Другие патогены, такие как грибы или протисты, не менее опасны, однако обычно не требуют генетического анализа для идентификации. На сегодняшний день основным приемом, позволяющим охарактеризовать разнообразие микроорганизмов в пробе, является метагеномный анализ. Подобный анализ стал возможным (и даже рутинным) благодаря разработке методов высокопроизводительного секвенирования. Биоразнообразие пробы можно охарактеризовать с помощью двух различных стратегий: таргетного секвенирования выбранных маркерных участков и полноценного тотального секвенирования метагенома.

Первый способ существенно проще технически, требует меньших временных и финансовых затрат на подготовку образцов, секвенирование и обработку данных. Однако он имеет существенное ограничение: позволяет провести только оценку разнообразия, тогда как второй способ позволяет получить исчерпывающую информацию о составе и генетических свойствах конкретного сообщества. Обычно в качестве маркерных участков в метагеномных образцах используются участки генов 16S или 18S рРНК у прокариот и эукариот соответственно или ITS-участки грибов [148–150]. Однако в зависимости от задачи маркерные участки могут быть и иными. К примеру, для характеристики резистома в метагеномном образце нужно использовать участки генов устойчивости к антибиотикам.

Второй способ требует существенно больших временных и финансовых затрат, но при тотальном секвенировании метагеномов мы получаем полногеномные данные, представляющие собой различные фрагменты ДНК организмов, содержащихся в анализируемом метагеномном образце, на основе которых впоследствии можно будет собрать референсный геном [148]. Анализировать подобные данные можно тремя различными способами. Первый способ — сравнение определенных маркерных последовательностей генов с известными последовательностями базы данных для подобных генов определенных организмов [151–153]. Второй способ основан на кластеризации всех чтений образца по таксономическим группам, например, на основе их сходства с известными полногеномными

последовательностями [154–157]. Наконец, третий способ связан со сборкой полученных контигов в целые гены или даже геномы *de novo* [158, 159]. В случае с идентификацией новых патогенов группа методов анализа данных тотального секвенирования метагенома может быть наиболее важной, поскольку позволяет не только оценить биоразнообразие образца, но и идентифицировать в его составе отдельные гены.

Таким образом, оба похода имеют свои достоинства и ограничения: секвенирование маркерных участков позволяет быстро и со сравнительно небольшими материальными затратами установить разнообразие генетического материала в образце, тогда как результаты тотального секвенирования метагенома позволяют получить исчерпывающую информацию о патогенных детерминантах (метатоксиком, метарезистом и пр.). Большая часть этой информации не будет представлять ценности, но позволит не упустить генетические элементы, обусловливающие эпидемическое значение патогенов в составе образца. Вероятно, возможно заменить полногеномный анализ сложным реагентным комплексом, состоящим из нескольких сотен олигонуклеотидных последовательностей, комплементарных наиболее важным и эпидемически значимым патогенным детерминантам, что позволит ускорить и удешевить процедуру метагеномгой характеристики образца. Тогда использование тотального\полногеномного секвенирования может быть оправдано в отдельных сложных случаях уже после первичной детекции для подробной характеристики генетических особенностей смешанного образца или уже изолированного патогена.

Особенности идентификации методами NGS вирусов и бактерий

Существующие методы NGS идеально подходят для анализа, идентификации и расшифровки генома выделенных в чистую культуру прокариотических организмов и открывают новые возможности в области идентификации неизвестных патогенов в смеси микроорганизмов. Определенную сложность при метагеномной характеристике образцов на предмет содержания в них прокариотических орагнизмов представляют выявление фактов горизонтального переноса генов от одного члена метагенома к другому и корректное распределение информации по отдельным представителям микробного сообщества. Решением этих проблем для хромосмонымх генетических элементов является повышение степени покрытия отдельными ридами хромосомных последовательностей отдельных компонентов метагенома.

Фактором, определяющим качество получаемой в результате секвенирования информации, является пробоподоготовка образца. Ее влияние можно проследить, анализируя особенности идентификации вирусов. Идентификация новых вирусов является трудной задачей. Основная причина этого — сложность отделения вирусной нуклеиновой кислоты от «мусорных» нуклеиновых кислот. Так, для крупных ДНК-вирусов выделение их нуклеиновой кислоты из вирусных частиц, полученных методом ультрафильтрации, приводит к существенному загрязнению образца так называемыми агентами переноса генов — невирусными ДНК, упакованными в вирусные капсиды [160]. В случае с маленькими высокоизменчивыми РНК-вирусами идентификация сложна вследствие как значительной примеси рРНК в образцах их нуклеиновой кислоты, так и сложности подбора специфических вырожденных праймеров, которые бы носили универсальный характер и позволили амплифицировать вирусные кДНК хотя бы на уровне семейства [161]. В настоящий момент для выявления новых вирусов с помощью NGS чаще всего совмещают модифицированный вариант ПЦР (VIDISCA) с последующим высокопроизводительным секвенированием (рис. 3) [162].

Метод VIDISCA начинается с селективного обогащения образца вирусной нуклеиновой кислотой, которое включает центрифугирование для удаления остаточного клеточного дебриса и митохондрий. Кроме того, используется обработка препарата нуклеазами для удаления мешающей анализу хромосомной и митохондриальной ДНК и РНК из лизированных клеток. Добавление РНК-азы в образец приводит к деградации клеточной РНК, при этом вирусная нуклеиновая кислота не деградирует, поскольку инкапсидирована внутри вирусной частицы. В дальнейшем нуклеазы инактивируются, и вирусные нуклеиновые кислоты экстрагируют из образцов. При этом РНК в ходе обратной транскрипции переводится в кДНК, а затем синтезируется вторая нить с целью получения двуцепочечной ДНК (от вирусной РНК или ДНК генома) [163]. Двуцепочечные ДНК обрабатывают частощепящими

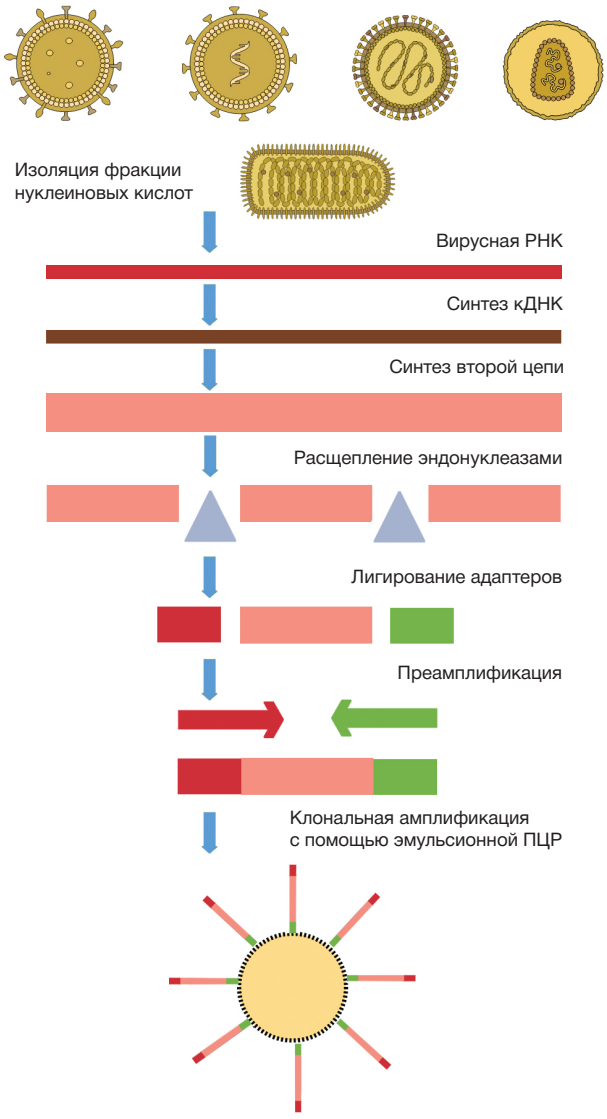


Рис. 3. Схема метода идентификации новых вирусных патогенов VIDISCA с использованием высокопроизводительного секвенирования

рестриктазами, специфичными для вирусных нуклеиновых кислот (HinP1-I и Mse-I), а затем расщепленную ДНК специфически лигируют с адаптером, содержащим липкие концы для вышеупомянутых рестриктаз. Целевые молекулы впоследствии амплифицируют с использованием праймеров, специфичных к адаптерным последовательностям, а затем проводится раунд селективного усиления с праймерами, удлиненными на один нуклеотид (G, A, T или C). Таким образом, используется 16 комбинаций праймеров, и каждый образец сравнивается с репрезентативным негативным контролем (незараженная сыворотка или плазма, а также супернатант неинфицированных культур). ПЦР-фрагменты, которые являются специфическими для «зараженных» клинических образцов, затем клонируют и секвенируют по Сэнгеру (клинический золотой стандарт).

Данная методика довольно трудоемка для исполнения, имеет низкую производительность и может обладать не самой высокой степенью воспроизводимости [163]. С целью повышения производительности данной технологии в настоящий момент пытаются создать ее модификацию, основанную на совмещении ПЦР с высокопроизводительным секвенированием: все амплифицированные фрагменты «сажают» на наночастицы и отправляют на массовое параллельное секвенирование. В оригинальной методике использовалось пиросеквенирование, лицензированное компанией Roshe. Однако в данном случае возникает серьезная проблема, т. к. в образцах обнаруживается низкое число прочтений вирусной нуклеиновой кислоты, вследствие чего обеспечивается слабое покрытие вирусного генома. Причиной этого является присутствие значительного количества клеточных рибосомальных РНК (рРНК) в пробах. Существует несколько подходов, позволяющих значительно снизить количество рРНК в пробах, такие как использование специально сконструированных рандомных праймеров, не отжигающихся на рРНК, использование частощепящих рестриктаз, имеющих низкую частоту расщепления рРНК, и, наконец, использование специфических олигонуклеотидов для блокировки синтеза кДНК на рРНК [163]. Однако, несмотря на то, что все вышеупомянутые технические приемы позволяют существенно снизить число амплифицированных фрагментов рРНК, полученный результат все равно позволяет идентифицировать вирусы только в 50 % зараженных образцов. Тем не менее, если проблема с удалением рРНК из образцов будет полностью решена, данная методика станет одним из наиболее быстрых и точных способов детекции ранее неизвестных вирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление новых бактерий и вирусов, угрожающих здоровью человека, является неизбежным процессом, отражающим общий ход биологической эволюции. Вирусы и бактерии являются наиболее генетически пластичными биологическими структурами благодаря таким молекулярным механизмам, как рекомбинация, реассортация и горизонтальный перенос генов. Наличие этих механизмов в сочетании с колоссальным потомством, а также селективное воздействие, которое зачастую возникает по вине самого человека, приводят к неизбежному появлению новых патогенов. Учитывая интенсивность взаимодействия людей из разных стран, распространение новых патогенных организмов представляет большую опасность. Снижение рисков возникновения эпидемий возможно только благодаря разработке новых методов контроля за распространением инфекций (вакцинация, лекарства, новые технологии стерилизации), а также методов выявления патогенов, которые должны учитывать их генетическую пластичность. Анализ имеющихся литературных данных показал, что на сегодняшний день не существует готовых коммерческих решений для идентификации организмов с новыми патогенными свойствами, а классические диагностические методы ПЦР и иммуноферментного анализа имеют существенные ограничения. Одним из ведущих методов идентификации широкого спектра патогенов, в том числе новых, и их генетических свойств становится высокопроизводительное секвенирование.

Высокопроизводительное секвенирование является одним из немногих доступных методов, способных не только детектировать конкретный патоген, но и подробно охарактеризовать его генетическую и эпигенетическую структуру, дать информацию о совокупности всех микроорганизмов образца, получая в результате исчерпывающий набор метагенетических данных. Необыкновенно быстрое развитие данной группы методов с каждым годом упрощает, удешевляет и убыстряет процедуру анализа. Разнообразие программного обеспечения и различных приложений позволяет решать с помощью этого метода самые разные задачи, в том числе задачу эффективной идентификации ранее неизвестных патогенов.

Литература

1. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1986–94. DOI: 10.1056/NEJMoa030685.
2. Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelshein S, Rose D, Green K, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1995–2005. DOI: 10.1056/NEJMoa030634.
3. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1977–85. DOI: 10.1056/NEJMoa030666.
4. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1967–76. DOI: 10.1056/NEJMoa030747.
5. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1953–66. DOI: 10.1056/NEJMoa030781.
6. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 2003 Apr 19; 361 (9366): 1319–25. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
7. Surjit M, Kumar R, Mishra RN, Reddy MK, Chow VT, Lal SK. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. J Virol. 2005 Sep; 79 (17): 11476–86. DOI: 10.1128/JVI.79.17.11476-11486.2005.
8. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science. 2003 May 30; 300 (5624):

1399–404. DOI: 10.1126/science.1085953.
9. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 15; 102 (7): 2430–5. DOI: 10.1073/pnas.0409608102.
10. Zhao GP. SARS molecular epidemiology: A Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007 Jun 29; 362 (1482): 1063–81. DOI: 10.1098/rstb.2007.2034.
11. Cleri DJ, Ricketti AJ, Vernaleo JR. Severe acute respiratory syndrome (SARS). Infect Dis Clin North Am. 2010 Mar; 24 (1): 175–202. DOI: 10.1016/j.idc.2009.10.005.
12. Cheng VC, Chan JF, To KK, Yuen KY. Clinical management and infection control of SARS: lessons learned. Antiviral Res. 2013 Nov; 100 (2): 407–19. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.08.016.
13. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. J Virol. 2007 Apr; 81 (7): 3051–7. DOI: 10.1128/JVI.01466-06.
14. Lau SK, Li KS, Huang Y, Shek CT, Tse H, Wang M, et al. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related Rhinolophus bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. J Virol. 2010 Mar; 84 (6): 2808–19. DOI: 10.1128/JVI.02219-09.
15. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. Nat Med. 2004 Apr; 10 (4): 368–73. DOI: 10.1038/nm1024.
16. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. J Virol. 2005 Jan; 79 (2): 884–95. DOI: 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.
17. Goes LG, Durigon EL, Campos AA, Hein N, Passos SD, Jerez JA. Coronavirus HKU1 in children, Brazil, 1995. Emerg Infect Dis. 2011 Jun; 17 (6): 1147–8. DOI: 10.3201/eid1706.101381.
18. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med. 2012 Nov 8; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
19. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. J Virol. 2013 Jul; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
20. World Health Organisation Global Alert and Response (GAR), MERS-CoV summary updates. Available from: http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/archive_updates/en/.
21. Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, et al. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. N Engl J Med. 2013 Aug 1; 369 (5): 407–16. DOI: 10.1056/NEJMoa1306742.
22. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeah AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: A descriptive study. Lancet Infect Dis. 2013 Sep; 13 (9): 752–61. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70204-4.
23. Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, et al. First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. Euro Surveill. 2013 Jun 13; 18 (24). pii: 20502.
24. de Sousa R, Reusken C, Koopmans M. MERS coronavirus: Data gaps for laboratory preparedness. J Clin Virol. 2014 Jan; 59 (1): 4–11. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.10.030.
25. Breban R, Riou J, Fontanet A. Interhuman transmissibility of Middle East respiratory syndrome coronavirus: estimation of pandemic risk. Lancet. 2013 Aug 24; 382 (9893): 694–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61492-0.
26. Coleman CM, Frieman MB. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. J Virol. 2014 May; 88 (10): 5209–12. DOI: 10.1128/JVI.03488-13.
27. Hui DS, Zumla A. Advancing priority research on the Middle East respiratory syndrome coronavirus. J Infect Dis. 2014 Jan 15; 209 (2): 173–6. DOI: 10.1093/infdis/jit591.
28. Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, Al-Rabeeah AA, Stephens GM. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. N Engl J Med. 2013 Jun 27; 368 (26): 2487–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1303729.
29. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med. 2001 Jun; 7 (6): 719–24. DOI: 10.1038/89098.
30. de Graaf M, Osterhaus AD, Fouchier RA, Holmes EC. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. J Gen Virol. 2008 Dec; 89 (Pt 12): 2933–42. DOI: 10.1099/vir.0.2008/006957-0.
31. Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. Virol J. 2009 Sep 9; 6: 138. DOI: 10.1186/1743-422X-6-138.
32. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. N Engl J Med. 2004 Jan 29; 350 (5): 443–50. DOI: 10.1056/NEJMoa025472.
33. Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. J Infect Dis. 2004 Apr 15; 189 (8): 1388–96. DOI: 10.1086/382482.
34. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. New Vaccine Surveillance, N. Burden of human metapneumovirus infection in young children. N Engl J Med. 2013 Feb 14; 368 (7): 633–43. DOI: 10.1056/NEJMoa1204630.
35. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. J Infect Dis. 2005 Feb 1; 191 (3): 382–6. DOI: 10.1086/426457.
36. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. J Infect Dis. 2003 Nov 15; 188 (10): 1571–7. DOI: 10.1086/379200.
37. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. PLoS Pathog. 2009 Apr; 5 (4): e1000391. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000391.
38. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. J Infect Dis. 2009 Jan 15; 199 (2): 196–200. DOI: 10.1086/595831.
39. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. J Infect Dis. 2010 Jun 1; 201 (11): 1633–43. DOI: 10.1086/652416.
40. von Linstow ML, Hшgh M, Hшgh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: Results from a prospective birth cohort study. Pediatr Infect Dis J. 2008 Oct; 27 (10): 897–902. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181757b16.
41. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Soderlund-Venermo M. Human bocavirus — the first 5 years. Rev Med Virol. 2012 Jan; 22 (1): 46–64. DOI: 10.1002/rmv.720.
42. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. Emerg Infect Dis. 2007Apr; 13 (4): 636–7. DOI: 10.3201/eid1304.061501.
43. Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W, et al. Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. PLoS Pathog. 2012; 8 (8): e1002899. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002899.
44. Deng X, Li Y, Qiu J. Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. J Virol Methods. 2014 Jan; 195: 112–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.012.
45. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der

Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. J Virol. 2009 Aug; 83 (15): 7739–48. DOI: 10.1128/JVI.00614-09.
46. Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. J Clin Virol. 2010 Feb; 47 (2): 143–7. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.11.030.
47. Han TH, Kim CH, Park SH, Kim EJ, Chung JY, Hwang ES. Detection of human bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. Arch Virol. 2009; 154 (12): 1923–7. DOI: 10.1007/s00705-009-0533-3.
48. Santos N, Peret TC, Humphrey CD, Albuquerque MC, Silva RC, Benati FJ, et al. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. J Clin Virol. 2010 Jun; 48 (2): 127–30. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.03.014.
49. Song JR, Jin Y, Xie ZP, Gao HC, Xiao NG, Chen WX, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. Emerg Infect Dis. 2010 Feb; 16 (2): 324–7. DOI: 10.3201/eid1602.090553.
50. Han TH, Chung JY, Hwang ES. Human bocavirus 2 in children, South Korea. Emerg Infect Dis. 2009 Oct; 15 (10): 1698–700. DOI: 10.3201/eid1510.090337.
51. Regamey N, Frey U, Deffernez C, Latzin P, Kaiser L; Swiss Paediatric Respiratory Research Group. Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory infections. Pediatr Infect Dis J. 2007 Feb; 26 (2): 177–9. DOI: 10.1097/01.inf.0000250623.43107.bc.
52. Schildgen O, Mьller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? Clin Microbiol Rev. 2008 Apr; 21 (2): 291–304. DOI: 10.1128/CMR.00030-07.
53. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. Emerg Infect Dis. 2006 May; 12 (5): 848–50. DOI: 10.3201/eid1205.051424.
54. Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, et al. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. Emerg Infect Dis. 2006 Oct; 12 (10): 1614–6. DOI: 10.3201/eid1210.060520.
55. Allander T. Human bocavirus. J Clin Virol. 2008 Jan; 41 (1): 29–33. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.10.026.
56. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. J Infect Dis. 2006 Nov 1; 194 (9): 1283–90. DOI: 10.1086/508219.
57. Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. Emerg Infect Dis. 2008 Feb; 14 (2): 217–21. DOI: 10.3201/eid1402.070851.
58. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. J Infect Dis. 2007 Apr 1; 195 (7): 1038–45. DOI: 10.1086/512163.
59. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. Clin Infect Dis. 2006 Aug 1; 43 (3): 283–8. DOI: 10.1086/505399.
60. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. J Infect Dis. 2006 Nov 1; 194 (9): 1276–82. DOI: 10.1086/508213.
61. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. P. 1691–1740.
62. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? Virology. 1995 Oct 1; 212 (2): 555–61. DOI: 10.1006/viro.1995.1513.
63. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. Clin Microbiol Rev. 2007 Apr; 20 (2): 243–67. DOI: 10.1128/CMR.00037-06.
64. Sharma S, Mayank A, Lal SK. Molecular events leading to the creation of a pandemic influenza virus. Indian J Microbiol. 2009 Dec; 49 (4): 332–8. DOI: 10.1007/s12088-009-0059-0.
65. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. J Virol. 1998 Sep; 72 (9): 7367–73.
66. Kasowski EJ, Garten RJ, Bridges CB. Influenza pandemic epidemiologic and virologic diversity: reminding ourselves of the possibilities. Clin Infect Dis. 2011 Jan 1; 52 Suppl 1: S44–9. DOI: 10.1093/cid/ciq010.
67. Brockwell-Staats C, Webster RG, Webby RJ. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). Influenza Other Respir Viruses. 2009 Sep; 3 (5): 207–13. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2009.00096.
68. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. Lancet Infect Dis. 2012 Sep; 12 (9): 687–95. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4.
69. To KK, Chan JF, Chen H, Li l, Yuen KY. The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities. Lancet Infect Dis. 2013 Sep; 13 (9): 809–21. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70167-1.
70. Chang SY, Lin PH, Tsai JC, Hung CC, Chang SC. The first case of H7N9 influenza in Taiwan. Lancet. 2013 May 11; 381 (9878): 1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60943-5.
71. Parry J. H7N9 avian flu infects humans for the first time. BMJ. 2013 Apr 4; 346: f2151. DOI: 10.1136/bmj.f2151.
72. Nicoll A, Danielsson N. A novel reassortant avian influenza A (H7N9) virus in China —what are the implications for Europe. Euro Surveill. 2013 Apr 11; 18 (15): 20452.
73. Hirst M, Astell CR, Griffith M, Coughlin SM, Moksa M, Zeng T, et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. Emerg Infect Dis. 2004 Dec; 10 (12): 2192–5. DOI: 10.3201/eid1012.040743.
74. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet. 2004 Feb 21; 363 (9409): 587–93. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15589-X.
75. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, de Jager CM. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. Euro Surveill. 2005 Dec; 10 (12): 264–8.
76. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A (H7N9) virus in China. N Engl J Med. 2014 Feb 6; 370 (6): 520–32. DOI: 10.1056/NEJMoa1304616.
77. Jonges M, Meijer A, Fouchier RA, Koch G, Li J, Pan JC, et al. Guiding outbreak management by the use of influenza A(H7Nx) virus sequence analysis. Euro Surveill. 2013 Apr 18; 18 (16): 20460.
78. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüssow H. Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4: a new challenge for microbiology. Appl Environ Microbiol. 2012 Jun; 78 (12): 4065–73. DOI: 10.1128/AEM.00217-12.
79. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weill FX. Escherichia coli O104:H4 south-west France, June 2011. Lancet Infect Dis. 2011 Oct; 11 (10): 732–3. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70266-3.
80. Werber D, Mason BW, Evans MR, Salmon RL. Preventing household transmission of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 infection: promptly separating siblings might be the key. Clin Infect Dis. 2008 Apr 15; 46 (8): 1189–96. DOI: 10.1086/587670.
81. Aldabe B, Delmas Y, Gault G, Vendrely B, Llanas B, Charron M, et al. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with Escherichia coli O104:H4, south-western France, June 2011. Euro Surveill. 2011 Aug 4; 16 (31). pii: 19934.
82. Kuijper EJ, Soonawala D, Vermont C, van Dissel JT. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with Escherichia coli O104:H4 in the Netherlands, May 2011. Euro Surveill. 2011 Jun 23; 16 (25). pii: 19897.
83. Hauri A, Gotsch U, Strotmann I, Krahn J, Bettge-Weller G, Westbrock H, et al. Secondary transmissions during the outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104 in Hesse, Germany, 2011. Euro Surveill. 2011 Aug 4; 16 (31). pii: 19937.

84. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent Escherichia coli outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: entero-aggregative-haemorrhagic Escherichia coli (EAHEC). Arch Microbiol. 2011 Dec; 193 (12): 883–91. DOI: 10.1007/s00203-011-0725-6.
85. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One. 2011; 6 (7): e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751.
86. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, et al. Origins of the E. coli strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. N Engl J Med. 2011 Aug 25; 365 (8): 709–17. DOI: 10.1056/NEJMoa1106920.
87. Mossoro C, Glaziou P, Yassibanda S, Lan NT, Bekondi C, Minssart P, et al. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEp-2 adherent Escherichia coli in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. J Clin Microbiol. 2002 Aug; 40 (8): 3086–8.
88. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis. 2011 Sep; 11 (9): 671–6. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
89. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis. 2005 Sep 15; 41 (6): 848–54.
90. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. JAMA. 2003 Feb 19; 289 (7): 885–8.
91. Lee K, Lee HS, Jang SJ, Park AJ, Lee MH, Song WK, et al. Antimicrobial resistance surveillance of bacteria in 1999 in Korea with a special reference to resistance of enterococci to vancomycin and gram-negative bacilli to third generation cephalosporin, imipenem, and fluoroquinolone. J Korean Med Sci. 2001 Jun; 16 (3): 262–70. DOI: 10.3346/jkms.2001.16.3.262.
92. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of Pseudomonas aeruginosa P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol. 2001 Jun; 39 (6): 2072–8. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2072-2078.2001.
93. Rhomberg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSTIC program report from the United States component (2005). Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Feb; 57 (2): 207–15. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.009.
94. Agodi A, Zarrilli R, Barchitta M, Anzaldi A, Di Popolo A, Mattaliano A, et al. Alert surveillance of intensive care unit-acquired Acinetobacter infections in a Sicilian hospital. Clin Microbiol Infect. 2006 Mar; 12 (3): 241–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01339.x.
95. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis. 2001 May 15; 32 Suppl 2: S94–103. DOI: 10.1086/320182.
96. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. Antibiotic therapy for Klebsiella pneumoniae bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis. 2004 Ju 1; 39 (1): 31–7. DOI: 10.1086/420816.
97. Wright GD, Poinar H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. Trends Microbiol. 2012 Apr; 20 (4): 157–9. DOI: 10.106/j.tim.2012.01.002.
98. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011 Aug 31; 477 (7365): 457–61. DOI: 10.1038/nature10388.
99. Wybenga-Groot LE, Draker K, Wright GD, Berghuis AM. Crystal structure of an aminoglycoside 60-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. Structure. 1999 May; 7 (5): 497–507.
100. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PLoS One. 2012; 7 (4): e34953. DOI: 10.1371/journal.pone.0034953.
101. Hon WC, McKay GA, Thompson PR, Sweet RM, Yang DS, Wright GD, et al. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. Cell. 1997 Jun 13; 89 (6): 887–95.
102. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med. 2006 Jan; 12 (1): 83–8. DOI: 10.1038/nm1347.
103. Barlow M, Hall BG. Origin and evolution of the AmpC betalactamases of Citrobacter freundii. Antimicrob Agents Chemother. 2002 May; 46 (5): 1190–8.
104. Koskiniemi S, Pranting M, Gullberg E, Näsvall J, Andersson DI. Activation of cryptic aminoglycoside resistance in Salmonella enterica. Mol Microbiol. 2011 Jun; 80 (6): 1464–78. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07657.x.
105. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus. Int J Med Microbiol. 2010 Feb; 300 (2–3): 98–103. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013.
106. Moore AM, Munck C, Sommer MO, Dantas G. Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. Front Microbiol. 2011 Oct 17; 2: 188. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00188.
107. Moore AM, Patel S, Forsberg KJ, Wang B, Bentley G, Razia Y, et al. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. PLoS One. 2013 Nov 13; 8 (11): e78822. DOI: 10.1371/journal.pone.0078822.
108. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2012 Oct; 55 (7): 905–14. DOI: 10.1093/cid/cis580.
109. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. Nature. 2011 Oct; 480 (7376): 241–4. DOI: 10.1038/nature10571.
110. Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, et al. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in Escherichia coli isolated from farmed fish in China. J Antimicrob Chemother. 2012; 67 (10): 2350–3. DOI: 10.1093/jac/dks250.
111. Holvoet K, Sampers I, Callens B, Dewulf J, Uyttendaele M. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from lettuce, irrigation water, and soil. Appl Environ Microbiol. 2013 Nov; 79 (21): 6677–83. DOI: 10.1128/AEM.01995-13.
112. McNeece G, Naughton V, Woodward MJ, Dooley JS, Naughton PJ. Array based detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria isolated from retail poultry meat in the UK and Ireland. Int J Food Microbiol. 2014 Jun 2; 179: 24–32. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.019.
113. Diarra MS, Delaquis P, Rempel H, Bach S, Harlton C, Aslam M, et al. Antibiotic resistance and diversity of Salmonella enteric serovars associated with broiler chickens. J Food Prot. 2014 Jan; 77 (1): 40–9. DOI: 10.4315/0362-028.JFP-13-251.
114. Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 26; 110 (9): 3435–40. DOI: 10.1073/pnas.1222743110.
115. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. Clin Microbiol Rev. 2005 Oct; 18 (4): 583–607. DOI: 10.1128/CMR.18.4.583-607.2005.
116. Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, David JC, Meyer RF, Smith TF, et al. Detection of Bacillus anthracis DNA by LightCycler PCR. J Clin Microbiol. 2002 Aug; 40 (8): 2897–902.
117. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR

detection of Escherichia coli O157:H7. Lett Appl Microbiol. 2003; 37 (3): 239–43.
118. Ibekwe AM, Grieve CM. Detection and quantification of Escherichia coli O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. J Appl Microbiol. 2003: 94 (3): 421–31.
119. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2002 Apr; 40 (4): 1567–8.
120. Morata P, Queipo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol. 1998 Sep; 36 (9): 2443–6.
121. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. Nature. 2005 Sep 15; 437 (7057): 376–80. DOI: 10.1038/nature03959.
122. Droege M, Hill B. The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. J Biotechnol. 2008 Aug 31; 136 (1–2): 3–10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.021.
123. Roche Shutting Down 454 Sequencing Business [Internet]. Genome Web LLC. c2016 — [cited 2017 Feb]. Available from: https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business.
124. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature. 2011 Jul 2; 475 (7356): 348–52. DOI: 10.1038/nature10242.
125. New Ion S5 and Ion S5 XL NGS Systems for Targeted Sequencing [Internet]. Available from: http://www.thermofisher.com/ru/ru/home/products-and-services/promotions/ion-s5-ngs.html?CID=fl-ions5.
126. Heger M. Thermo Fisher Launches New Systems to Focus on Plug and Play Targeted Sequencing. Genome Web LLC [Internet]. 2015 Sep 01 [cited 2017 Feb]. Available from: https://www.genomeweb.com/sequencing-technology/thermo-fisher-launches-new-systems-focus-plug-and-play-targeted-sequencing.
127. Shaikh-Lesko R. Sequencing on the Seven Seas. The Scientist [Internet]. 2014 Aug 01 [cited 2017 Feb]. Available from: http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40556/title/Sequencing-on-the-Seven-Seas/.
128. Ma Z, Lee RW, Li B, Kenney P, Wang Y, Erikson J, et al. Isothermal amplification method for next-generation sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 27; 110 (35): 14320–3. DOI: 10.1073/pnas.1311334110.
129. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature. 2008 Nov 6; 456 (7218): 53–9. DOI: 10.1038/nature07517.
130. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Kostantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. PLoS One. 2012; 7 (2): e30087. DOI: 10.1371/journal.pone.0030087.
131. Nakamura K, Oshima T, Morimoto T, Ikeda S, Yoshikawa H, Shiwa Y, et al Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. Nucleic Acids Res. 2011 Jul; 39 (13): e90. DOI: 10.1093/nar/gkr344.
132. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. Nucleic Acids Res. 2008; 36 (16): e105. DOI: 10.1093/nar/gkn425.
133. Kebschull JM, Zador AM. Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. Nucleic Acids Res. 2015 Dec 2; 43 (21): e143. DOI: 10/1093/nar/gkv717.
134. Aird D, Ross MG, Chen WS, Danielsson M, Fennel T, Russ C, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. Genome Biol. 2011; 12 (2): R18. DOI: 10.1186/gb-2011-12-2-r18.
135. Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. Genome Biol. 2011; 12 (2): 217. DOI: 10.1186/gb-2011-2-217.
136. Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifenberger JG, Sass LE, McInerney P, et al. Direct RNA sequencing. Nature. 2009 Oct 8; 461 (7265): 814–8. DOI: 10.1038/nature08390.
137. Battered Helicos BioSciences Corporation (HLCS) Files for Chapter 11. BioSpace [Internet]. 2012 Nov 16 [cited 2017 Feb]. Available from: http://www.biospace.com/News/battered-helicos-biosciences-corporation-files-for/280101.
138. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science. 2009 Jan 2; 323 (5910): 133–8. DOI: 10.1126/science.1162986.
139. Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. Nat Methods. 2010 Jun; 7 (6): 461–5. DOI: 10.1038/nmeth.1459.
140. Travers KJ, Chin CS, Rank DR, Eid JS, Turner SW. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. Nucleic Acids Res. 2010 Aug; 38 (15): e159. DOI: 10.1093/nar/gkq543.
141. Pacific Biosciences Launches New Sequencing Platform Based on Its SMRT Technology. Pacific Biosciences [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2017 Feb]. Available from: http://investor.pacificbiosciences.com/releasedetail.cfm?releaseid=934581.
142. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 26; 93 (24): 13770–3.
143. Check Hayden E. Pint-sized DNA sequencer impresses first users. Nature. 2015 May 7; 521 (7550): 15–6. DOI: 10.1038/521015a.
144. Mikheyev AS, Tin MM. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. Mol Ecol Resour. 2014 Nov; 14 (6): 1097–102.
145. Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. Genome Med. 2015 Sep 29; 7: 99. DOI: 10.1186/s13073-015-220-9.
146. Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJ, et al. Real-time strain typing and analysis of antibiotic resistance potential using Nanopore MinION sequencing. 2016 Jul 26; 5 (1): 32. DOI: 10.1186/s13742-016-0137-2.
147. Solanum pennellii (new cultivar) — PlabiPD [Internet]. Aachen, Germany: IBG-2 Forschungszentrum Jülich, Institute of Biology-1 RWTH. c2014–2017 [cited 2017 Feb]. Available from: http://www.plabipd.de/portal/solanum-pennellii.
148. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. Appl Environ Microbiol. 2006 Jul; 72 (7): 5069–72. DOI: 10.1128/AEM.03006-05.
149. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. Bioinformatics. 2009 Jul 15; 25 (14): 1754–60. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
150. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009; 10 (3): R25. DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
151. Liu B, Gibbons T, Ghodsi M, Ghodsi M, Treangen T, Pop M. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. BMC Genomics. 2011; 12 Suppl 2: S4. DOI: 10.1186/1471-2164-12-S2-S4.
152. Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. Nat Methods. 2012 Jun 10; 9 (8): 811–4. DOI: 10.1038/nmeth.2066.
153. Wu M, Eisen JA. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. Genome Biol. 2008 Oct 13; 9 (10): R151. DOI: 10.1186/gb-2008-9-10-r151.
154. Sharpton TJ, Riesenfeld SJ, Kembel SW, Ladau J, O'Dwyer JP, Green JL, et al. PhylOTU: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data. PLoS Comput Biol. 2011 Jan 20; 7 (1): e1001061. DOI: 10.1371/journal.pcbi.10001061.
155. Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh H, Weber N, Schuster SC. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. Genome Res. 2011 Sep; 21 (9): 1552–60. DOI: 10.1101/

gr.120618.111.
156. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server — a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics. 2008 Sep 19; 9: 386. DOI: 10.1186/1471-2105-9-386.
157. Gerlach W, Stoye J. Taxonomic classification of metagenomic shotgun sequences with CARMA3. Nucleic Acids Res. 2011 Aug; 39 (14): e91. DOI: 10.1093/nar/gkr225.
158. Namiki T, Hachiya T, Tanaka H, Sakakibara Y. MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. Nucleic Acids Res. 2012 Nov 1; 40 (20): e155. DOI: 10.1093/nar/gks678.
159. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. Meta-IDBA: a de Novo assembler for metagenomic data. Bioinformatics. 2011 Jul 1; 27 (13): i94–101. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr216.
160. McDaniel LD, Young E, Delaney J, Ruhnau F, Ritchie KB, Paul JH. High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. Science. 2010 Oct 1; 330 (6000): 50. DOI: 10.1126/science.1192243.
161. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Deijs M, Canuti M, van der Hoek L. Metagenomics in virus discovery. ISBT Science Series. 2013; 8: 193–4.
162. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007 Apr; 5 (2): 245–53. DOI: 10.1586/14787210.5.2.245.
163. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Canuti M, Deijs M, Cotten M, Jebbink MF, et al. Identification of a novel human rhinovirus C type by antibody capture VIDISCA-454. Viruses. 2015 Jan 19; 7 (1): 239–51. DOI: 10.3390/v7010239.

References

1. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1986–94. DOI: 10.1056/NEJMoa030685.
2. Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelshein S, Rose D, Green K, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1995–2005. DOI: 10.1056/NEJMoa030634.
3. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1977–85. DOI: 10.1056/NEJMoa030666.
4. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1967–76. DOI: 10.1056/NEJMoa030747.
5. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med. 2003 May 15; 348 (20): 1953–66. DOI: 10.1056/NEJMoa030781.
6. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 2003 Apr 19; 361 (9366): 1319–25. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
7. Surjit M, Kumar R, Mishra RN, Reddy MK, Chow VT, Lal SK. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. J Virol. 2005 Sep; 79 (17): 11476–86. DOI: 10.1128/JVI.79.17.11476-11486.2005.
8. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science. 2003 May 30; 300 (5624): 1399–404. DOI: 10.1126/science.1085953.
9. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 15; 102 (7): 2430–5. DOI: 10.1073/pnas.0409608102.
10. Zhao GP. SARS molecular epidemiology: A Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007 Jun 29; 362 (1482): 1063–81. DOI: 10.1098/rstb.2007.2034.
11. Cleri DJ, Ricketti AJ, Vernaleo JR. Severe acute respiratory syndrome (SARS). Infect Dis Clin North Am. 2010 Mar; 24 (1): 175–202. DOI: 10.1016/j.idc.2009.10.005.
12. Cheng VC, Chan JF, To KK, Yuen KY. Clinical management and infection control of SARS: lessons learned. Antiviral Res. 2013 Nov; 100 (2): 407–19. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.08.016.
13. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. J Virol. 2007 Apr; 81 (7): 3051–7. DOI: 10.1128/JVI.01466-06.
14. Lau SK, Li KS, Huang Y, Shek CT, Tse H, Wang M, et al. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related Rhinolophus bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. J Virol. 2010 Mar; 84 (6): 2808–19. DOI: 10.1128/JVI.02219-09.
15. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. Nat Med. 2004 Apr; 10 (4): 368–73. DOI: 10.1038/nm1024.
16. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. J Virol. 2005 Jan; 79 (2): 884–95. DOI: 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.
17. Goes LG, Durigon EL, Campos AA, Hein N, Passos SD, Jerez JA. Coronavirus HKU1 in children, Brazil, 1995. Emerg Infect Dis. 2011 Jun; 17 (6): 1147–8. DOI: 10.3201/eid1706.101381.
18. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med. 2012 Nov 8; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
19. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. J Virol. 2013 Jul; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
20. World Health Organisation Global Alert and Response (GAR), MERS-CoV summary updates. Available from: http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/archive_updates/en/.
21. Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, et al. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. N Engl J Med. 2013 Aug 1; 369 (5): 407–16. DOI: 10.1056/NEJMoa1306742.
22. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeah AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: A descriptive study. Lancet Infect Dis. 2013 Sep; 13 (9): 752–61. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70204-4.
23. Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, et al. First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. Euro Surveill. 2013 Jun 13; 18 (24). pii: 20502.
24. de Sousa R, Reusken C, Koopmans M. MERS coronavirus: Data gaps for laboratory preparedness. J Clin Virol. 2014 Jan; 59 (1): 4–11. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.10.030.
25. Breban R, Riou J, Fontanet A. Interhuman transmissibility of Middle East respiratory syndrome coronavirus: estimation of pandemic risk. Lancet. 2013 Aug 24; 382 (9893): 694–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61492-0.
26. Coleman CM, Frieman MB. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. J Virol. 2014 May; 88 (10): 5209–12. DOI: 10.1128/JVI.03488-13.

27. Hui DS, Zumla A. Advancing priority research on the Middle East respiratory syndrome coronavirus. J Infect Dis. 2014 Jan 15; 209 (2): 173–6. DOI: 10.1093/infdis/jit591.
28. Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, Al-Rabeeah AA, Stephens GM. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. N Engl J Med. 2013 Jun 27; 368 (26): 2487–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1303729.
29. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med. 2001 Jun; 7 (6): 719–24. DOI: 10.1038/89098.
30. de Graaf M, Osterhaus AD, Fouchier RA, Holmes EC. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. J Gen Virol. 2008 Dec; 89 (Pt 12): 2933–42. DOI: 10.1099/vir.0.2008/006957-0.
31. Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. Virol J. 2009 Sep 9; 6: 138. DOI: 10.1186/1743-422X-6-138.
32. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. N Engl J Med. 2004 Jan 29; 350 (5): 443–50. DOI: 10.1056/NEJMoa025472.
33. Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. J Infect Dis. 2004 Apr 15; 189 (8): 1388–96. DOI: 10.1086/382482.
34. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. New Vaccine Surveillance, N. Burden of human metapneumovirus infection in young children. N Engl J Med. 2013 Feb 14; 368 (7): 633–43. DOI: 10.1056/NEJMoa1204630.
35. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. J Infect Dis. 2005 Feb 1; 191 (3): 382–6. DOI: 10.1086/426457.
36. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. J Infect Dis. 2003 Nov 15; 188 (10): 1571–7. DOI: 10.1086/379200.
37. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. PLoS Pathog. 2009 Apr; 5 (4): e1000391. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000391.
38. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. J Infect Dis. 2009 Jan 15; 199 (2): 196–200. DOI: 10.1086/595831.
39. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. J Infect Dis. 2010 Jun 1; 201 (11): 1633–43. DOI: 10.1086/652416.
40. von Linstow ML, Hшgh M, Hшgh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: Results from a prospective birth cohort study. Pediatr Infect Dis J. 2008 Oct; 27 (10): 897–902. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181757b16.
41. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Soderlund-Venermo M. Human bocavirus — the first 5 years. Rev Med Virol. 2012 Jan; 22 (1): 46–64. DOI: 10.1002/rmv.720.
42. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. Emerg Infect Dis. 2007Apr; 13 (4): 636–7. DOI: 10.3201/eid1304.061501.
43. Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W, et al. Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. PLoS Pathog. 2012; 8 (8): e1002899. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002899.
44. Deng X, Li Y, Qiu J. Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. J Virol Methods. 2014 Jan; 195: 112–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.012.
45. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. J Virol. 2009 Aug; 83 (15): 7739–48. DOI: 10.1128/JVI.00614-09.
46. Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. J Clin Virol. 2010 Feb; 47 (2): 143–7. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.11.030.
47. Han TH, Kim CH, Park SH, Kim EJ, Chung JY, Hwang ES. Detection of human bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. Arch Virol. 2009; 154 (12): 1923–7. DOI: 10.1007/s00705-009-0533-3.
48. Santos N, Peret TC, Humphrey CD, Albuquerque MC, Silva RC, Benati FJ, et al. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. J Clin Virol. 2010 Jun; 48 (2): 127–30. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.03.014.
49. Song JR, Jin Y, Xie ZP, Gao HC, Xiao NG, Chen WX, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. Emerg Infect Dis. 2010 Feb; 16 (2): 324–7. DOI: 10.3201/eid1602.090553.
50. Han TH, Chung JY, Hwang ES. Human bocavirus 2 in children, South Korea. Emerg Infect Dis. 2009 Oct; 15 (10): 1698–700. DOI: 10.3201/eid1510.090337.
51. Regamey N, Frey U, Deffernez C, Latzin P, Kaiser L; Swiss Paediatric Respiratory Research Group. Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory infections. Pediatr Infect Dis J. 2007 Feb; 26 (2): 177–9. DOI: 10.1097/01.inf.0000250623.43107.bc.
52. Schildgen O, Mьller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? Clin Microbiol Rev. 2008 Apr; 21 (2): 291–304. DOI: 10.1128/CMR.00030-07.
53. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. Emerg Infect Dis. 2006 May; 12 (5): 848–50. DOI: 10.3201/eid1205.051424.
54. Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, et al. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. Emerg Infect Dis. 2006 Oct; 12 (10): 1614–6. DOI: 10.3201/eid1210.060520.
55. Allander T. Human bocavirus. J Clin Virol. 2008 Jan; 41 (1): 29–33. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.10.026.
56. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. J Infect Dis. 2006 Nov 1; 194 (9): 1283–90. DOI: 10.1086/508219.
57. Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. Emerg Infect Dis. 2008 Feb; 14 (2): 217–21. DOI: 10.3201/eid1402.070851.
58. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. J Infect Dis. 2007 Apr 1; 195 (7): 1038–45. DOI: 10.1086/512163.
59. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. Clin Infect Dis. 2006 Aug 1; 43 (3): 283–8. DOI: 10.1086/505399.
60. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. J Infect Dis. 2006 Nov 1; 194 (9): 1276–82. DOI: 10.1086/508213.
61. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. P. 1691–1740.
62. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? Virology. 1995 Oct 1; 212 (2): 555–61. DOI: 10.1006/viro.1995.1513.
63. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. Clin Microbiol Rev. 2007 Apr; 20 (2): 243–67. DOI: 10.1128/CMR.00037-06.
64. Sharma S, Mayank A, Lal SK. Molecular events leading to the creation of a pandemic influenza virus. Indian J Microbiol. 2009

Dec; 49 (4): 332–8. DOI: 10.1007/s12088-009-0059-0.
65. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. J Virol. 1998 Sep; 72 (9): 7367–73.
66. Kasowski EJ, Garten RJ, Bridges CB. Influenza pandemic epidemiologic and virologic diversity: reminding ourselves of the possibilities. Clin Infect Dis. 2011 Jan 1; 52 Suppl 1: S44–9. DOI: 10.1093/cid/ciq010.
67. Brockwell-Staats C, Webster RG, Webby RJ. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1). Influenza Other Respir Viruses. 2009 Sep; 3 (5): 207–13. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2009.00096.
68. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. Lancet Infect Dis. 2012 Sep; 12 (9): 687–95. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4.
69. To KK, Chan JF, Chen H, Li l, Yuen KY. The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities. Lancet Infect Dis. 2013 Sep; 13 (9): 809–21. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70167-1.
70. Chang SY, Lin PH, Tsai JC, Hung CC, Chang SC. The first case of H7N9 influenza in Taiwan. Lancet. 2013 May 11; 381 (9878): 1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60943-5.
71. Parry J. H7N9 avian flu infects humans for the first time. BMJ. 2013 Apr 4; 346: f2151. DOI: 10.1136/bmj.f2151.
72. Nicoll A, Danielsson N. A novel reassortant avian influenza A (H7N9) virus in China —what are the implications for Europe. Euro Surveill. 2013 Apr 11; 18 (15): 20452.
73. Hirst M, Astell CR, Griffith M, Coughlin SM, Moksa M, Zeng T, et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. Emerg Infect Dis. 2004 Dec; 10 (12): 2192–5. DOI: 10.3201/eid1012.040743.
74. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet. 2004 Feb 21; 363 (9409): 587–93. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15589-X.
75. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, de Jager CM. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. Euro Surveill. 2005 Dec; 10 (12): 264–8.
76. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A (H7N9) virus in China. N Engl J Med. 2014 Feb 6; 370 (6): 520–32. DOI: 10.1056/NEJMoa1304616.
77. Jonges M, Meijer A, Fouchier RA, Koch G, Li J, Pan JC, et al. Guiding outbreak management by the use of influenza A(H7Nx) virus sequence analysis. Euro Surveill. 2013 Apr 18; 18 (16): 20460.
78. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüssow H. Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4: a new challenge for microbiology. Appl Environ Microbiol. 2012 Jun; 78 (12): 4065–73. DOI: 10.1128/AEM.00217-12.
79. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weill FX. Escherichia coli O104:H4 south-west France, June 2011. Lancet Infect Dis. 2011 Oct; 11 (10): 732–3. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70266-3.
80. Werber D, Mason BW, Evans MR, Salmon RL. Preventing household transmission of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 infection: promptly separating siblings might be the key. Clin Infect Dis. 2008 Apr 15; 46 (8): 1189–96. DOI: 10.1086/587670.
81. Aldabe B, Delmas Y, Gault G, Vendrely B, Llanas B, Charron M, et al. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with Escherichia coli O104:H4, south-western France, June 2011. Euro Surveill. 2011 Aug 4; 16 (31). pii: 19934.
82. Kuijper EJ, Soonawala D, Vermont C, van Dissel JT. Household transmission of haemolytic uraemic syndrome associated with Escherichia coli O104:H4 in the Netherlands, May 2011. Euro Surveill. 2011 Jun 23; 16 (25). pii: 19897.
83. Hauri A, Gotsch U, Strotmann I, Krahn J, Bettge-Weller G, Westbrock H, et al. Secondary transmissions during the outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104 in Hesse, Germany, 2011. Euro Surveill. 2011 Aug 4; 16 (31). pii: 19937.
84. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent Escherichia coli outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: entero-aggregative-haemorrhagic Escherichia coli (EAHEC). Arch Microbiol. 2011 Dec; 193 (12): 883–91. DOI: 10.1007/s00203-011-0725-6.
85. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One. 2011; 6 (7): e22751. DOI: 10.1371/journal.pone.0022751.
86. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, et al. Origins of the E. coli strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. N Engl J Med. 2011 Aug 25; 365 (8): 709–17. DOI: 10.1056/NEJMoa1106920.
87. Mossoro C, Glaziou P, Yassibanda S, Lan NT, Bekondi C, Minssart P, et al. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEp-2 adherent Escherichia coli in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. J Clin Microbiol. 2002 Aug; 40 (8): 3086–8.
88. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis. 2011 Sep; 11 (9): 671–6. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
89. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis. 2005 Sep 15; 41 (6): 848–54.
90. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. JAMA. 2003 Feb 19; 289 (7): 885–8.
91. Lee K, Lee HS, Jang SJ, Park AJ, Lee MH, Song WK, et al. Antimicrobial resistance surveillance of bacteria in 1999 in Korea with a special reference to resistance of enterococci to vancomycin and gram-negative bacilli to third generation cephalosporin, imipenem, and fluoroquinolone. J Korean Med Sci. 2001 Jun; 16 (3): 262–70. DOI: 10.3346/jkms.2001.16.3.262.
92. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of Pseudomonas aeruginosa P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol. 2001 Jun; 39 (6): 2072–8. DOI: 10.1128/JCM.39.6.2072-2078.2001.
93. Rhomberg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSTIC program report from the United States component (2005). Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Feb; 57 (2): 207–15. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.009.
94. Agodi A, Zarrilli R, Barchitta M, Anzaldi A, Di Popolo A, Mattaliano A, et al. Alert surveillance of intensive care unit-acquired Acinetobacter infections in a Sicilian hospital. Clin Microbiol Infect. 2006 Mar; 12 (3): 241–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01339.x.
95. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clin Infect Dis. 2001 May 15; 32 Suppl 2: S94–103. DOI: 10.1086/320182.
96. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. Antibiotic therapy for Klebsiella pneumoniae bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis. 2004 Ju 1; 39 (1): 31–7. DOI: 10.1086/420816.
97. Wright GD, Poinar H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. Trends Microbiol. 2012 Apr; 20 (4): 157–9. DOI: 10.106/j.tim.2012.01.002.
98. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011 Aug 31; 477 (7365): 457–61. DOI: 10.1038/nature10388.

99. Wybenga-Groot LE, Draker K, Wright GD, Berghuis AM. Crystal structure of an aminoglycoside 60-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. Structure. 1999 May; 7 (5): 497–507.
100. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PLoS One. 2012; 7 (4): e34953. DOI: 10.1371/journal.pone.0034953.
101. Hon WC, McKay GA, Thompson PR, Sweet RM, Yang DS, Wright GD, et al. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. Cell. 1997 Jun 13; 89 (6): 887–95.
102. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med. 2006 Jan; 12 (1): 83–8. DOI: 10.1038/nm1347.
103. Barlow M, Hall BG. Origin and evolution of the AmpC betalactamases of Citrobacter freundii. Antimicrob Agents Chemother. 2002 May; 46 (5): 1190–8.
104. Koskiniemi S, Pranting M, Gullberg E, Näsvall J, Andersson DI. Activation of cryptic aminoglycoside resistance in Salmonella enterica. Mol Microbiol. 2011 Jun; 80 (6): 1464–78. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07657.x.
105. Lindsay JA. Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus. Int J Med Microbiol. 2010 Feb; 300 (2–3): 98–103. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013.
106. Moore AM, Munck C, Sommer MO, Dantas G. Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. Front Microbiol. 2011 Oct 17; 2: 188. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00188.
107. Moore AM, Patel S, Forsberg KJ, Wang B, Bentley G, Razia Y, et al. Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. PLoS One. 2013 Nov 13; 8 (11): e78822. DOI: 10.1371/journal.pone.0078822.
108. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2012 Oct; 55 (7): 905–14. DOI: 10.1093/cid/cis580.
109. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. Nature. 2011 Oct; 480 (7376): 241–4. DOI: 10.1038/nature10571.
110. Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, et al. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in Escherichia coli isolated from farmed fish in China. J Antimicrob Chemother. 2012; 67 (10): 2350–3. DOI: 10.1093/jac/dks250.
111. Holvoet K, Sampers I, Callens B, Dewulf J, Uyttendaele M. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from lettuce, irrigation water, and soil. Appl Environ Microbiol. 2013 Nov; 79 (21): 6677–83. DOI: 10.1128/AEM.01995-13.
112. McNeece G, Naughton V, Woodward MJ, Dooley JS, Naughton PJ. Array based detection of antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria isolated from retail poultry meat in the UK and Ireland. Int J Food Microbiol. 2014 Jun 2; 179: 24–32. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.019.
113. Diarra MS, Delaquis P, Rempel H, Bach S, Harlton C, Aslam M, et al. Antibiotic resistance and diversity of Salmonella enteric serovars associated with broiler chickens. J Food Prot. 2014 Jan; 77 (1): 40–9. DOI: 10.4315/0362-028.JFP-13-251.
114. Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 26; 110 (9): 3435–40. DOI: 10.1073/pnas.1222743110.
115. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. Clin Microbiol Rev. 2005 Oct; 18 (4): 583–607. DOI: 10.1128/CMR.18.4.583-607.2005.
116. Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, David JC, Meyer RF, Smith TF, et al. Detection of Bacillus anthracis DNA by LightCycler PCR. J Clin Microbiol. 2002 Aug; 40 (8): 2897–902.
117. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR detection of Escherichia coli O157:H7. Lett Appl Microbiol. 2003; 37 (3): 239–43.
118. Ibekwe AM, Grieve CM. Detection and quantification of Escherichia coli O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. J Appl Microbiol. 2003: 94 (3): 421–31.
119. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2002 Apr; 40 (4): 1567–8.
120. Morata P, Queipo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol. 1998 Sep; 36 (9): 2443–6.
121. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. Nature. 2005 Sep 15; 437 (7057): 376–80. DOI: 10.1038/nature03959.
122. Droege M, Hill B. The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. J Biotechnol. 2008 Aug 31; 136 (1–2): 3–10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.03.021.
123. Roche Shutting Down 454 Sequencing Business [Internet]. Genome Web LLC. c2016 — [cited 2017 Feb]. Available from: https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business.
124. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature. 2011 Jul 2; 475 (7356): 348–52. DOI: 10.1038/nature10242.
125. New Ion S5 and Ion S5 XL NGS Systems for Targeted Sequencing [Internet]. Available from: http://www.thermofisher.com/ru/ru/home/products-and-services/promotions/ion-s5-ngs.html?CID=fl-ions5.
126. Heger M. Thermo Fisher Launches New Systems to Focus on Plug and Play Targeted Sequencing. Genome Web LLC [Internet]. 2015 Sep 01 [cited 2017 Feb]. Available from: https://www.genomeweb.com/sequencing-technology/thermo-fisher-launches-new-systems-focus-plug-and-play-targeted-sequencing.
127. Shaikh-Lesko R. Sequencing on the Seven Seas. The Scientist [Internet]. 2014 Aug 01 [cited 2017 Feb]. Available from: http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40556/title/Sequencing-on-the-Seven-Seas/.
128. Ma Z, Lee RW, Li B, Kenney P, Wang Y, Erikson J, et al. Isothermal amplification method for next-generation sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 27; 110 (35): 14320–3. DOI: 10.1073/pnas.1311334110.
129. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature. 2008 Nov 6; 456 (7218): 53–9. DOI: 10.1038/nature07517.
130. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Kostantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. PLoS One. 2012; 7 (2): e30087. DOI: 10.1371/journal.pone.0030087.
131. Nakamura K, Oshima T, Morimoto T, Ikeda S, Yoshikawa H, Shiwa Y, et al Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. Nucleic Acids Res. 2011 Jul; 39 (13): e90. DOI: 10.1093/nar/gkr344.
132. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. Nucleic Acids Res. 2008; 36 (16): e105. DOI: 10.1093/nar/gkn425.
133. Kebschull JM, Zador AM. Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets. Nucleic Acids Res. 2015 Dec 2; 43 (21): e143. DOI: 10/1093/nar/gkv717.
134. Aird D, Ross MG, Chen WS, Danielsson M, Fennel T, Russ C, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. Genome Biol. 2011; 12 (2): R18. DOI: 10.1186/gb-2011-12-2-r18.
135. Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. Genome Biol. 2011; 12 (2): 217. DOI: 10.1186/gb-2011-2-217.

136. Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifenberger JG, Sass LE, McInerney P, et al. Direct RNA sequencing. Nature. 2009 Oct 8; 461 (7265): 814–8. DOI: 10.1038/nature08390.
137. Battered Helicos BioSciences Corporation (HLCS) Files for Chapter 11. BioSpace [Internet]. 2012 Nov 16 [cited 2017 Feb]. Available from: http://www.biospace.com/News/battered-helicos-biosciences-corporation-files-for/280101.
138. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science. 2009 Jan 2; 323 (5910): 133–8. DOI: 10.1126/science.1162986.
139. Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, et al. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. Nat Methods. 2010 Jun; 7 (6): 461–5. DOI: 10.1038/nmeth.1459.
140. Travers KJ, Chin CS, Rank DR, Eid JS, Turner SW. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. Nucleic Acids Res. 2010 Aug; 38 (15): e159. DOI: 10.1093/nar/gkq543.
141. Pacific Biosciences Launches New Sequencing Platform Based on Its SMRT Technology. Pacific Biosciences [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2017 Feb]. Available from: http://investor.pacificbiosciences.com/releasedetail.cfm?releaseid=934581.
142. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 26; 93 (24): 13770–3.
143. Check Hayden E. Pint-sized DNA sequencer impresses first users. Nature. 2015 May 7; 521 (7550): 15–6. DOI: 10.1038/521015a.
144. Mikheyev AS, Tin MM. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. Mol Ecol Resour. 2014 Nov; 14 (6): 1097–102.
145. Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. Genome Med. 2015 Sep 29; 7: 99. DOI: 10.1186/s13073-015-220-9.
146. Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJ, et al. Real-time strain typing and analysis of antibiotic resistance potential using Nanopore MinION sequencing. 2016 Jul 26; 5 (1): 32. DOI: 10.1186/s13742-016-0137-2.
147. Solanum pennellii (new cultivar) — PlabiPD [Internet]. Aachen, Germany: IBG-2 Forschungszentrum Jülich, Institute of Biology-1 RWTH. c2014–2017 [cited 2017 Feb]. Available from: http://www.plabipd.de/portal/solanum-pennellii.
148. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. Appl Environ Microbiol. 2006 Jul; 72 (7): 5069–72. DOI: 10.1128/AEM.03006-05.
149. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. Bioinformatics. 2009 Jul 15; 25 (14): 1754–60. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
150. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009; 10 (3): R25. DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
151. Liu B, Gibbons T, Ghodsi M, Ghodsi M, Treangen T, Pop M. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. BMC Genomics. 2011; 12 Suppl 2: S4. DOI: 10.1186/1471-2164-12-S2-S4.
152. Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. Nat Methods. 2012 Jun 10; 9 (8): 811–4. DOI: 10.1038/nmeth.2066.
153. Wu M, Eisen JA. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. Genome Biol. 2008 Oct 13; 9 (10): R151. DOI: 10.1186/gb-2008-9-10-r151.
154. Sharpton TJ, Riesenfeld SJ, Kembel SW, Ladau J, O'Dwyer JP, Green JL, et al. PhylOTU: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data. PLoS Comput Biol. 2011 Jan 20; 7 (1): e1001061. DOI: 10.1371/journal.pcbi.10001061.
155. Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh H, Weber N, Schuster SC. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. Genome Res. 2011 Sep; 21 (9): 1552–60. DOI: 10.1101/gr.120618.111.
156. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server — a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics. 2008 Sep 19; 9: 386. DOI: 10.1186/1471-2105-9-386.
157. Gerlach W, Stoye J. Taxonomic classification of metagenomic shotgun sequences with CARMA3. Nucleic Acids Res. 2011 Aug; 39 (14): e91. DOI: 10.1093/nar/gkr225.
158. Namiki T, Hachiya T, Tanaka H, Sakakibara Y. MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. Nucleic Acids Res. 2012 Nov 1; 40 (20): e155. DOI: 10.1093/nar/gks678.
159. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. Meta-IDBA: a de Novo assembler for metagenomic data. Bioinformatics. 2011 Jul 1; 27 (13): i94–101. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr216.
160. McDaniel LD, Young E, Delaney J, Ruhnau F, Ritchie KB, Paul JH. High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. Science. 2010 Oct 1; 330 (6000): 50. DOI: 10.1126/science.1192243.
161. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Deijs M, Canuti M, van der Hoek L. Metagenomics in virus discovery. ISBT Science Series. 2013; 8: 193–4.
162. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007 Apr; 5 (2): 245–53. DOI: 10.1586/14787210.5.2.245.
163. Jazaeri Farsani SM, Oude Munnink BB, Canuti M, Deijs M, Cotten M, Jebbink MF, et al. Identification of a novel human rhinovirus C type by antibody capture VIDISCA-454. Viruses. 2015 Jan 19; 7 (1): 239–51. DOI: 10.3390/v7010239.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ У НОВОРОЖДЕННЫХ ОТДЕЛЕНИЯ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ

А. Б. Гордеев[1]✉, Л. А. Любасовская[1], Ю. В. Родченко[1], Д. В. Дубоделов[1], И. С. Мукосей[2], Т. О. Кочеткова[2], И. В. Никитина[3], О. В. Ионов[3], В. В. Зубков[3], Д. Ю. Трофимов[2], Т. В. Припутневич[1]

[1] Отдел микробиологии и клинической фармакологии,
Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

[2] Отдел клинической и молекулярной генетики,
Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

[3] Отдел неонатологии и педиатрии,
Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

Staphylococcus epidermidis — представитель нормальной микрофлоры человека, способный вызывать опасные заболевания у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Различные штаммы *S. epidermidis* обладают разным спектром генов, ассоциированных с их резистентностью к антимикробным препаратам и патогенностью. По результатам анализа данных полных геномных секвенирований четырнадцати штаммов *S. epidermidis* изучено генетическое разнообразие штаммов, циркулирующих в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных НЦАГиП им. В. И. Кулакова. Выявлена принадлежность штаммов к восьми сиквенс-типам, из которых чаще встречались ST2 и ST59, принадлежащие к единому клональному комплексу CC2. К данному клональному комплексу относились 10 из 14 штаммов. Показано, что изученные штаммы обладали широким спектром генов резистентности к антимикробным препаратам. Обнаружено 15 различных генов, обуславливающих резистентность штаммов к аминогликозидам, бета-лактамным антибиотикам, фузидиевой кислоте, макролидам, линкозамидам, стрептограмину B, тетрациклину и триметоприму. Выявлены гены, ассоциированные с патогенностью (*aae, atlE, aap, embp*), встречающиеся в геномах изученных штаммов с разной частотой. В геномах девяти штаммов был обнаружен инсерционный элемент *IS256*, а в геномах семи штаммов — гены *ica*-оперона, отвечающего за синтез белков матрикса биопленок.

Ключевые слова: полиморфизм, полногеномное секвенирование, патогенность, резистентность, *Staphylococcus epidermidis*, новорожденные, сиквенс-тип

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0019 от 05.06.2014, шифр заявки 2014-14-579-0001-065).

✉ **Для корреспонденции:** Гордеев Алексей Борисович
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; gordeew@vega.protres.ru

Статья получена: 02.02.2017 **Статья принята в печать:** 18.02.2017

GENETIC POLYMORPHISM OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* STRAINS IN PATIENTS OF THE NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT

Gordeev AB[1]✉, Lyubasovskaya LA[1], Rodchenko JV[1], Dubodelov DV[1], Mukosey IS[2], Kochetkova TO[2], Nikitina IV[3], Ionov OV[3], Zubkov VV[3], Trofimov DY[2], Priputnevich TV[1]

[1] Department of Microbiology and Clinical Pharmacology,
Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

[2] Department of Clinical and Molecular Genetics,
Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

[3] Department of Neonatology and Pediatrics,
Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Staphylococcus epidermidis is a member of the normal bacterial flora of humans capable of causing potentially dangerous diseases in neonates with very or extremely low birth weight. The number of genes responsible for virulence and antibiotic resistance may vary in different *S. epidermidis* strains. We sequenced isolates of *S. epidermidis* to explore genetic diversity of 14 strains circulating in the Neonatal Intensive Care Unit of Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. Among the studied strains, 8 sequence types were identified, the most frequent being ST2 and ST59, both of which belong to the clonal complex CC2. Of 14 studied strains, 10 were of CC2 type. The studied strains revealed a variety of genes responsible for antibiotic resistance. We found 15 genes that provided resistance to aminoglycosides, beta-lactam antibiotics, fusidic acid, macrolides, lincosamides, streptogramin B, tetracycline, and trimethoprim. We identified a number of genes associated with virulence (*aae, atlE, aap, embp*), whose frequency in the studied isolates was varied. The insertion element *IS256* was detected in 9 strains, and 7 strains revealed the presence of the *ica*-operon responsible for the biosynthesis of the biofilm matrix proteins.

Keywords: polymorphism, NGS, virulence, resistance, *Staphylococcus epidermidis*, neonates, sequence type

Funding: this study was supported by the Grant Agreement No. 14.607.21.0019 of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation dated June 5, 2014 (ID 2014-14-579-0001-065).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey Gordeev
ul. Akademika Oparina, d. 4, Moscow, Russia, 117997; gordeew@vega.protres.ru

Received: 02.02.2017 **Accepted:** 18.02.2017

Staphylococcus epidermidis является представителем нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека [1, 2]. Однако у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела бактерии этого вида могут вызывать такие опасные заболевания, как пневмония, сепсис и катетер-ассоциированные инфекции. Патогенность разных штаммов *S. epidermidis* варьируется в широких пределах: от способности вызывать заболевания до комменсального способа существования. Несмотря на определенный прогресс в изучении механизмов патогенности *S. epidermidis*, они до сих пор изучены не полностью.

Различные штаммы *S. epidermidis* обладают разными генетическими свойствами. Разработан и широко используется метод мультилокусного секвенирования (Multilocus Sequence Typing, MLST), который позволяет подразделять штаммы бактерий на большое количество сиквенс-типов. Хотя число сиквенс-типов у *S. epidermidis* довольно велико, обнаружено, что большинство штаммов, циркулирующих в госпиталях различных стран мира, можно объединить в единый клональный комплекс CC2, к которому относятся близкородственные сиквенс-типы [2, 3]. Среди госпитальных штаммов *S. epidermidis* широко распространена устойчивость к метициллину, ассоциированная с мобильными генетическими элементами, которые получили название хромосомных стафилококковых кассет mec (Staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec) [1, 4]. Устойчивость к метициллину определяется геном *mecA*, который кодирует альтернативный пенициллин-связывающий белок, обладающий пониженным сродством к метициллину (оксациллину). Метициллин-резистентность крайне важна в клинической практике, поскольку наличие гена *mecA* обуславливает устойчивость штамма стафилококка ко всем бета-лактамным антибиотикам (пенициллины, включая защищенные, цефалоспорины и карбапенемы). Набор генов, находящихся в элементах SCCmec, может различаться. Среди них встречаются гены устойчивости к другим антибиотикам, инсерционные элементы, такие как *IS431*, плазмиды, такие как *pT181*, и транспозоны, например *Tn554*.

Среди госпитальных штаммов *S. epidermidis* также часто отмечают устойчивость к аминогликозидам и макролидам и, в меньшей степени, к тетрациклину, хлорамфениколу, ванкомицину и клиндамицину [5]. Устойчивость к метициллину (оксациллину) у госпитальных штаммов, по некоторым данным, превышает 70 % [6, 7]. Гены устойчивости к антимикробным препаратам у *S. epidermidis* часто находятся в мобильных генетических элементах. В целом отмечается высокий уровень корреляции между наличием генов резистентности и фенотипическим проявлением резистентности у штаммов бактерий [1, 8].

Штаммы *S. epidermidis* имеют ряд факторов патогенности — генов, кодирующих синтез белков, которые способствуют развитию инфекции и существованию бактерий в организме человека. Несмотря на наличие работ, связывающих уровень патогенности бактерий с какими-либо факторами патогенности, в настоящее время невозможно выделить маркеры патогенности, позволяющие однозначно отделить патогенные штаммы от непатогенных [1]. Возможно, что прогресс в решении этой задачи будет связан с изучением комплексных взаимодействий между бактериями и иммунной системой человека. Многие факторы патогенности входят в состав базовой части генома и имеются у всех или у подавляющего большинства штаммов *S. epidermidis*. Другие же факторы, ассоциированные с патогенностью, содержатся только у части штаммов. Один из подходов к анализу генетических свойств штаммов микроорганизмов — это применение высокопроизводительного полногеномного секвенирования, которое позволяет проводить комплексный анализ генетических свойств штаммов с детекцией большого количества генов и их вариантов с помощью биоинформатического анализа полученных сборок. В НЦАГиП им. В. И. Кулакова проводят исследования генетического полиморфизма различных видов микроорганизмов, циркулирующих в стационаре [2, 9].

Целью данной работы было изучение генетического полиморфизма госпитальных штаммов *S. epidermidis*, выделенных от новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии НЦАГиП им. В. И. Кулакова.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

У новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) НЦАГиП были выделены 14 штаммов *S. epidermidis*: у 5 новорожденных из образцов трахеобронхеального аспирата (штаммы 3, 7, 8, 13, 14), у 3 — из кала (штаммы 1, 5, 9), у 2 — из зева (штаммы 4, 10), у 2 — из крови (штаммы 2, 11), у 1 — из отделяемого конъюнктивы глаза (штамм 12) и у 1 новорожденного из постмортального материала, ткани легкого (штамм 6). Все новорожденные на момент взятия биологического материала имели признаки инфекции (пневмония, сепсис, конъюнктивит), при вскрытии у погибшего ребенка была подтверждена пневмония. Все новорожденные имели низкую и экстремально низкую массу тела.

Посев клинического материала проводили на колумбийский агар (Bio-Rad, США) с добавлением 5 % бараньей крови («ЭкоЛаб», Россия) и маннитно-солевым агаром (Liofilchem, Италия). Чашки инкубировали в термостате при температуре 36–37 °C в течение 48 ч.

Видовую идентификацию выделенных культур осуществляли с помощью метода масс-спектрометрии матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с времяпролетным анализатором масс (MALDI-TOF MS). Образцы для масс-спектрометрического анализа готовили следующим образом. Суточные культуры микроорганизмов (1–2 колонии) наносили на ячейки стальной мишени, подсушивали в течение 1–2 мин, затем сверху наслаивали 2 мкл насыщенного раствора матрицы. В качестве матрицы применяли альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту (Bruker Daltonics, Германия) в виде насыщенных растворов в смеси 50 % ацетонитрила, 2,5 % трифторуксусной кислоты. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальными для масс-спектрометрии. Кристаллы оставляли на воздухе в течение 5–10 мин до полного высыхания. Влажность и температуру при этом не контролировали. Каждый образец наносили на стальную мишень в двух повторах, с которых, в свою очередь, снимали масс-спектры в автоматическом режиме. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером 337 нм. Все измерения проводили в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона m/z от 2000 до 20 000. Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс

известных белков *Escherichia coli*. Образец наносили на три ячейки стальной мишени, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 серий измерений по 50 импульсов лазера в каждой. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). Точность измерения масс составляла ± 2 Да. Кластерный анализ, сопоставление получаемых масс-спектров с имеющимися в базах данных производили с помощью программного пакета Biotyper 1.1 (Bruker Daltonics, Германия).

Определение чувствительности штаммов к антибиотикам проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact (bioMérieux, Франция) по протоколу производителя. Определяли чувствительность штаммов к набору антибиотиков, включавшему бензилпенициллин, цефокситин, гентамицин, клиндамицин, эритромицин, ванкомицин и фузидиевую кислоту. Интерпретацию результатов производили автоматически с помощью программного обеспечения прибора на основании критериев интепретации, рекомендованых EUCAST, 2015 г.

Геномную ДНК выделяли из свежевыращенной культуры путем лизирования лизоцимом и протеиназой K, дальнейшую очистку ДНК проводили при помощи фенолхлороформной экстракции. Для получения библиотек ДНК использовали наборы Ion Xpress Plus Fragment Library Kit и Ion Xpress Barcode Adapters (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Качество библиотек проверяли на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer system с наборами HighSense DNA Kit (Agilent Technologies, США) согласно протоколу производителя. Для постановки эмульсионной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обогащения сфер использовали наборы Ion OneTouch Template Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на платформе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit и чипами 316 v1 (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Сборку коротких прочтений (ридов) в последовательности большей длины (контиги) осуществляли с помощью программного обеспечения MIRA 3 с использованием параметров genome, *de novo*, accurate.

Определение сиквенс-типов проводили с помощью программы MLST 1.8 [10]. Использовали результаты анализа полиморфизма по семи локусам: *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyr*, *tpi* и *yqiL* — проведенного для собранных нуклеотидных последовательностей (контигов). Поиск генов, ассоциированных с резистентностью к антимикробным препаратам, осуществляли с помощью программы ResFinder 2.1 [11]. Минимально допустимая степень сходства составляла 90 %, а минимальная длина перекрытия последовательностей — 70 %. Поиск генов и анализ локусов, ассоциированных с патогенностью, проводили путем анализа соответствующих нуклеотидных последовательностей, полученных из базы данных GenBank [12], с помощью программы BLAST [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У новорожденных ОРИТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова выделено 14 штаммов *S. epidermidis*. Для каждого штамма выполнено полногеномное секвенирование, на основе полученных данных произведено сиквенс-типирование, поиск и анализ генов, ассоциированных с патогенностью штаммов и устойчивостью к антимикробным препаратам. Результаты сборки геномов представлены в табл. 1.

Сиквенс-типирование выявило принадлежность штаммов к восьми сиквенс-типам. Наиболее часто встречались сиквенс-типы ST2 и ST59 (по четыре штамма). Остальные шесть штаммов относились к сиквенс-типам: ST19, ST22, ST87, ST173, ST210, ST218. Штаммов с новыми неизвестными сиквенс-типами обнаружено не было.

Результаты поиска генов резистентности *S. epidermidis* к антимикробным препаратам представлены в табл. 2 и 3.

Среди штаммов *S. epidermidis* обнаружены гены резистентности к аминогликозидам *aacA-aphD*, *aadD* и *aphA*. Наиболее распространен ген *aacA-aphD*, обнаруженный в геномах двенадцати штаммов (штаммы 1–12). Ген *aadD* встречался в геномах пяти штаммов (штаммы 1, 2, 4, 9, 10, а ген *aphA* — в геномах двух штаммов (штаммы 3, 7).

Таблица 1. Характеристики сборки геномов штаммов *S. epidermidis* на основе полногеномного секвенирования

№ штамма	Количество контигов	Длина генома, млн п. н.	N50, п. н.	GC-состав, %
1	249	2,6	96 722	32,03
2	312	2,8	126 592	31,86
3	186	2,5	116 897	32,05
4	291	2,8	97 452	31,89
5	162	2,5	73 775	32,16
6	166	2,7	140 749	31,82
7	178	2,5	105 269	32,14
8	147	2,5	62 617	32,08
9	442	2,7	121 229	32,04
10	529	2,8	138 397	31,80
11	192	2,6	104 362	32,03
12	183	2,6	103 850	32,02
13	110	2,5	229 537	31,94
14	211	2,6	122 737	31,96

Таблица 2. Анализ антибиотикорезистентности штаммов *S. epidermidis*

Антимикробный препарат	Штамм /материал/													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	кал	кровь	трахеобронхиальный аспират	зев	кал	ткань легкого	трахеобронхиальный аспират	трахеобронхиальный аспират	кал	зев	кровь	отделяемое конъюктивы	трахеобронхиальный аспират	трахеобронхиальный аспират
Бензилпенициллин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Цефокситин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Гентамицин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Клиндамицин	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S
Эритромицин	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
Ванкомицин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Фузидиевая кислота	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S

Примечание. R — резистентный штамм (resistant), S — чувствительный штамм (sensitive).

Таблица 3. Наличие генов резистентности у штаммов *S. epidermidis*

Ген резистентности	Штамм /материал/													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	кал	кровь	трахеобронхиальный аспират	зев	кал	ткань легкого	трахеобронхиальный аспират	трахеобронхиальный аспират	кал	зев	кровь	отделяемое конъюктивы	трахеобронхиальный аспират	трахеобронхиальный аспират
aacA-aphD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
aadD	+	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–
aphA	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
blaZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mecA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
fusB	–	+	–	+	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–
fusC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
vanA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
vanB	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
vanZ	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
lnu(A)	+	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+
vga(A)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
vga(B)	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
msr(A)	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	+	–	–
mph(C)	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	–	–
erm(A)	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
erm(B)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
erm(C)	+	–	+	–	–	–	+	+	–	+	–	–	–	+
vat(B)	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
tet(M)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
tet(K)	+	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	+
dfr(G)	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
dfr(K)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Сиквенс-тип	ST210	ST2	ST59	ST2	ST87	ST2	ST59	ST218	ST22	ST2	ST59	ST59	ST19	ST173

Примечание. Символами + и – обозначены наличие и отсутствие гена резистентности в геноме штамма. Ген *aacA-aphD* — устойчивость штаммов к амикацину, гентамицину, канамицину и тобрамицину; ген *aadD* — устойчивость к амикацину, канамицину, неомицину и тобрамицину; *aphA* — к канамицину и неомицину; *blaZ* — к пенициллинам; *mecA* — к бета-лактамным антибиотикам; *fusB*, *fusC* — к фузидиевой кислоте; *vanA*, *vanB*, *vanZ* — к ванкомицину; *lnu(A)*, *vga(A)*, *vga(B)* — к линкозамидам (клиндамицину); *msr(A)*, *mph(C)* — к макролидным антибиотикам (эритромицину); *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* — к макролидным антибиотикам и линкозамидам одновременно; *vat(B)* — к стрептограмину В; *tet(M)*, *tet(K)* — к тетрациклину; *dfr(G)*, *dfr(K)* — к триметоприму.

Считается, что эти гены фенотипически проявляются в наличии устойчивости не ко всему набору антибиотиков из группы аминогликозидов, а только к некоторым антибиотикам данной группы. Согласно данным, опубликованным в последние годы [8], локус *aacA-aphD* фенотипически проявляется в наличии устойчивости штаммов к амикацину, гентамицину, канамицину и тобрамицину. Ген *aadD* проявляется в наличии устойчивости к амикацину, канамицину, неомицину и тобрамицину, а ген *aphA* — в наличии устойчивости к канамицину и неомицину. В нашем исследовании тринадцать штаммов, несущих гены устойчивости, были фенотипически устойчивыми к гентамицину.

Обнаружено два гена, обуславливающих устойчивость к бета-лактамным антибиотикам. Ген *blaZ*, кодирующий бета-лактамазу, способную расщеплять пенициллины, встречался в геномах всех изученных штаммов. Фенотипически все штаммы были устойчивы к бензилпенициллину. Устойчивость к метициллину у стафилококков определяется геном *mecA*, который кодирует альтернативный пенициллин-связывающий белок, обладающий пониженным сродством к метициллину [1, 14]. Ген *mecA*, обуславливающий устойчивость к метициллину, обнаружен у тринадцати штаммов из четырнадцати (штаммы 1–12, 14). При этом фенотипически все четырнадцать штаммов проявляли устойчивость к метициллину (цефокситину), т. е. были метициллин-резистентными.

Из двух известных генов, обуславливающих устойчивость к фузидиевой кислоте, обнаружен только ген *fusB*, который встречается в геномах шести штаммов (штаммы 2, 4–6, 9, 10). Ген *fusC* обнаружен не был. При этом фенотипически к фузидиевой кислоте оказались устойчивыми десять штамов из четырнадцати.

В некоторых работах у стафилококков были обнаружены гены *vanA*, характерные для ванкомицин-устойчивых стафилококков [8]. Однако у наших штаммов генов устойчивости к ванкомицину *vanA*, *vanB* и *vanZ*, а также фенотипически устойчивых к ванкомицину штаммов обнаружено не было.

Фенотипически устойчивость к линкозамидам (клиндамицин) проявлялась у семи штаммов. Обнаружено два гена, ассоциированных с резистентностью к линкозамидам. Ген *lnu(A)* встречался в геномах четырех штаммов (штаммы 1, 3, 8, 14), а ген *vga(B)* — у одного штамма (штамм 5). Ген *vga(A)*, который также способен вызвать устойчивость к линкозамидам, обнаружен не был.

Выявлено десять штаммов, фенотипически устойчивых к макролидам (эритромицин). В геномах четырех штаммов (штаммы 6, 7, 11, 12) обнаружен ген *msr(A)*, а в геномах трех штаммов (штаммы 7, 11, 12) — ген *mph(C)*. Эти гены способны вызывать устойчивость бактерий к макролидам, в частности к эритромицину.

Из трех генов, обуславливающих устойчивость штаммов к макролидам и к линкозамидам одновременно [8, 11], в геномах бактерий обнаружено два. Ген *erm(C)* встречается в геномах шести штаммов (штаммы 1, 3, 7, 8, 10, 14), а ген *erm(A)* — у одного штамма (штамм 5). Ген *erm(B)* в геномах не обнаружен.

При лечении заболеваний, вызванных *S. epidermidis*, применяют ряд антибиотиков, для которых определяется фенотипическая устойчивость штаммов. В ходе работы для таких групп антибиотиков проводили поиск генов устойчивости, а также поиск генов резистентности к антибиотикам из других групп. Обнаружение генов резистентности к препаратам, не применяющимся при лечении заболеваний, представляет несомненный интерес. Во-первых, существует потенциальная возможность горизонтального переноса генов штаммам других видов микроорганизмов с помощью мобильных генетических элементов и плазмид. Во-вторых, анализ наличия/отсутствия таких генов позволяет оценить генетические свойства штаммов.

Ген *vat(B)*, способный вызывать устойчивость к стрептограмину В и, возможно, к линкозамидам [8], обнаружен у одного штамма (штамм 5). Из двух генов, обуславливающих устойчивость стафилококков к тетрациклину, в геномах обнаружен только ген *tet(K)*, встречающийся в четырех штаммах (штаммы 1, 7, 8, 14). Ген *tet(M)* не обнаружен. У двух штаммов (штаммы 1, 3) показано наличие гена *dfr(G)*, который ассоциирован с устойчивостью к триметоприму. Другой ген устойчивости к триметоприму, *dfr(K)*, в геномах не обнаружен.

Результаты поиска генов *S. epidermidis*, ассоциированных с патогенностью, представлены в табл. 4.

Таблица 4. Наличие генов, ассоциированных с патогенностью, у штаммов *S. epidermidis*

№ штамма	Ген						
	icaA	*icaD*	*IS256*	*aap*	*embp*	*atlE*	*aae*
1	–	–	+	–	+	+	+
2	+	+	+	+	–	+	+
3	–	–	–	+	+	+	+
4	+	+	+	+	–	+	+
5	–	–	+	–	+	+	+
6	+	+	+	+	–	+	+
7	–	–	–	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	–	+	+	+
10	+	+	+	+	–	+	+
11	–	–	–	+	+	+	+
12	–	–	–	+	+	+	+
13	–	–	–	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. Символами + и – обозначены наличие и отсутствие гена резистентности в геноме штамма.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на разнообразие сиквенс-типов (восемь разных вариантов), десять штаммов из четырнадцати принадлежали к крупному клональному комплексу CC2. Эти штаммы относились к сиквенс-типам ST2, ST22, ST59 и ST87. По данным научной литературы, ST59 и ST22 относятся к наиболее распространенным в госпиталях сиквенс-типам *S. epidermidis* [2, 3]. Сиквенс-тип ST2 является родительским для одного из двух главных кластеров (кластер I) клонального комплекса CC2. В многоцентровом исследовании, проведенном M. Miragaia и соавт. в 2007 г. в 18 странах мира, было показано распространение близкородственных штаммов *S. epidermidis* в госпиталях различных точек мира [3], в 2013 г. аналогичные результаты были получены в России [2]. Эти данные позволяют сделать предположение о наличии у штаммов клонального комплекса CC2 генетических особенностей, позволяющих им длительно циркулировать и персистировать в условиях стационара. Такими свойствами могут быть как повышенная устойчивость к антибиотикам, так и особое сочетание генов антибиотикорезистентности в хромосомных элементах, повышенная способность к образованию биопленок и т. д. Требуется более глубокое изучение популяции штаммов, принадлежащих к CC2, выделенных из клинического материала.

Изученные штаммы стафилококков обладают различным спектром генов резистентности к ряду антимикробных препаратов. Аналогично другим исследованиям [1, 6, 7, 14], разные штаммы включают в себя различный набор генов резистентности. Гены устойчивости к пенициллинам обнаружены у всех четырнадцати (100 %) штаммов, к метициллину — у тринадцати (93 %) штаммов, к аминогликозидам — у двенадцати (86 %), к макролидам — у десяти (71 %), к линкозамидам — у семи (50 %), к фузидиевой кислоте — у шести (43 %), к тетрациклину — у четырех (29 %) и к триметоприму — у двух (14 %) штаммов. Гены устойчивости к ванкомицину не выявлены. Отдельные штаммы содержали от 1 (штамм 13) до 8 (штаммы 1, 7) генов резистентности к антимикробным препаратам каждый.

Следует отметить, что наличие того или иного гена резистентности не свидетельствует о его обязательной экспрессии в количестве, достаточном для фенотипического проявления. Однако в любом случае наличие нуклеотидных последовательностей генов может проявиться фенотипически: либо сразу в виде приобретения устойчивости к тому или иному антимикробному препарату, либо использоваться в качестве исходного материала для эволюционных процессов и возникновения устойчивости к антимикробным препаратам в дальнейшем.

С другой стороны, поиск генов антибиотикорезистентности у штаммов не охватывает все потенциально возможные механизмы резистентности. Известно, что ряд механизмов связан с мутациями собственных генов, и, соответственно, с модификацией или инактивацией собственных ферментов. К примеру, резистентность стафилококков к метициллину может быть связана не только с наличием кассеты mec, но и с модификацией нормального пенициллин-связывающего белка. Кроме того, снижение чувствительности штамма к антибиотикам может быть следствием повышения активности работы эффлюксных помп, выводящих антибиотик из клетки. Отмечены и другие механизмы антибиотикорезистентности. В задачи данной работы не входило проведение анализа нуклеотидных последовательностей генов и их локализации, выявление мутаций, способных повлиять на работу генов, и измерение уровня экспрессии генов. В проведенном исследовании наличие генов резистентности и фенотипическая устойчивость к антибиотикам полностью совпадали в отношении пенициллина, линкозамидов и макролидов. В отношении других антибиотиков фенотипическую устойчивость проявляло, наоборот, большее количество штаммов, чем было обнаружено генов резистентности, что говорит о наличии других механизмов антибиотикорезистентности. Исследования в этой области проводятся в настоящее время.

Таким образом, госпитальные штаммы, выделенные от новорожденных ОРИТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова, обладают широким спектром генов резистентности к антимикробным препаратам.

У *S. epidermidis* существует большое количество генов, ассоциированных с патогенностью. Однако большая часть этих генов выполняет определенные функции и при патогенном, и при комменсальном способе существования *S. epidermidis*. Поэтому наличие таких генов патогенности у эпидермальных стафилококков не позволяет сделать вывод, является ли данный штамм *S. epidermidis* патогенным или нет [1, 14, 15]. При этом отмечены определенные корреляции между наличием у штаммов факторов патогенности и особенностями патогенеза госпитальных штаммов [16–18].

У всех четырнадцати штаммов обнаружены гены *aae* и *atlE*. Оба гена кодируют бифункциональные белки, выполняющие как функции аутолизина, так и адгезина, и принимают участие в процессе формирования биопленок. Эти гены широко распространены у *S. epidermidis*. Другие гены, ассоциированные с патогенностью, встречаются только у части изученных штаммов. Обнаружены штаммы, несущие гены *aap*, *embp*, и гены *icaA* и *icaD*, входящие в состав *ica*-оперона. Ген *aap* кодирует белок Aap, который является наиболее важным фактором, участвующим в белокзависимом пути формирования биопленок. Ген *embp* также участвует в образовании биопленок, а гены *ica*-оперона — в синтезе экзополисахаридного внутриклеточного адгезина, который принимает участие как в процессе формирования биопленок, так и в процессах иммунной эвазии.

У ряда штаммов также обнаружен инсерционный элемент *IS256*, для присутствия которого показано наличие корреляции с патогенностью штаммов [17].

Таким образом, спектр генов, ассоциированных с патогенностью, у разных госпитальных штаммов, выделенных от новорожденных ОРИТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова, варьируется. Отдельные штаммы *S. epidermidis* содержали от 4 (штаммы 1, 3, 5, 7, 11, 12, 13) до 7 (штаммы 8, 14) генов, ассоциированных с патогенностью. Интересно, что в штаммах 1 и 7 обнаружено наибольшее количество генов резистентности, и в то же время эти штаммы содержали минимальное число генов патогенности.

ВЫВОДЫ

Изучен генетический полиморфизм четырнадцати госпитальных штаммов *S. epidermidis*, выделенных у новорожденных, находившихся на лечении в ОРИТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова. Выявлена принадлежность штаммов к восьми разным сиквенс-типам, причем 10 из 14 изученных штаммов принадлежали к крупному клональному комплексу CC2. Обнаружено, что госпитальные штаммы,

выделенные у новорожденных ОРИТ НЦАГиП им. В. И. Кулакова, обладают широким спектром генов резистентности к антимикробным препаратам и генов патогенности. У изученных штаммов обнаружено 15 различных генов, обуславливающих резистентность штаммов к аминогликозидам, бета-лактамным антибиотикам, фузидиевой кислоте, макролидам, линкозамидам, стрептограмину В, тетрациклину и триметоприму. Выявлены гены, ассоциированные с патогенностью (*aae*, *atlE*, *aap*, *embp*, *icaA*, *icaD*), встречающиеся в геномах изученных штаммов с разной частотой, а также обнаружен инсерционный элемент *IS256*.

Литература

1. Otto M. Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections. Semin Immunopathol. 2012 Mar; 34 (2): 201–14.
2. Любасовская Л. А., Корниенко М. А., Припутневич Т. В., Ильина Е. Н., Щеголев А. И. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии. Антибиот. и химиотер. 2013; 58 (3–4): 25–32.
3. Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for Staphylococcus epidermidis from multilocus sequence typing data. J Bacteriol. 2007 Mar; 189 (6): 2540–52.
4. Salgueiro VC, Iorio NL, Ferreira MC, Chamon RC, Dos Santos KR. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal Staphylococcus epidermidis isolated from neonates. BMC Microbiol. 2017 Jan 13; 17 (1): 15.
5. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 2014 Oct; 27 (4): 870–926.
6. Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS Program results for 2011. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Jun; 76 (2): 206–13.
7. Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ. Molecular epidemiology of Staphylococcus epidermidis clinical isolates from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Sep; 56 (9): 4656–61.
8. McManus BA, Coleman DC, Deasy EC, Brennan GI, O'Connell B, Monecke S, et al. Comparative genotypes, staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) genes and antimicrobial resistance amongst Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus isolates from infections in humans and companion animals. PLoS One. 2015 Sep 17; 10 (9): e0138079.
9. Дубоделов Д. В., Любасовская Л. А., Шубина Е. С., Мукосей И. С., Коростин Д. О., Кочеткова Т. О. и др. Генетические детерминанты резистентности к β-лактамным антибиотикам госпитальных штаммов Klebsiella pneumoniae, выделенных у новорожденных. Генетика. 2016; 52 (9): 1097–102.
10. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol. 2012 Apr; 50 (4): 1355–61.
11. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012 Nov; 67 (11): 2640–4.
12. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. Nucleic Acids Res. 2013 Jan; 41 (Database issue): D36–42.
13. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215 (3): 403–10.
14. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. J Clin Microbiol. 2004 Dec; 42 (12): 5614–9.
15. Thomas JC, Zhang L, Robinson DA. Differing lifestyles of Staphylococcus epidermidis as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. Infect Genet Evol. 2014 Mar; 22: 257–64.
16. Rogers KL, Rupp ME, Fey PD. The presence of icaADBC is detrimental to the colonization of human skin by Staphylococcus epidermidis. Appl Environ Microbiol. 2008 Oct; 74 (19): 6155–7.
17. Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, Wen Y, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of Staphylococcus epidermidis. J Hosp Infect. 2005 Dec; 61 (4): 342–8.
18. Conlan S, Mijares LA; NISC Comparative Sequencing Program, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, et al. Staphylococcus epidermidis pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. Genome Biol. 2012 Jul 25; 13 (7): R64.

References

1. Otto M. Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections. Semin Immunopathol. 2012 Mar; 34 (2): 201–14.
2. Lubasovskaya LA, Kornienko MA, Priputnevich TV, Ilyina EN, Shchegolev AI. [Microbiological and molecular genetic characteristics of coagulase-negative staphylococcal isolates from neonates in intensive care unit]. Antibiot Khimioter. 2013; 58 (3–4): 25–32. Russian.
3. Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Inferring a population structure for Staphylococcus epidermidis from multilocus sequence typing data. J Bacteriol. 2007 Mar; 189 (6): 2540–52.
4. Salgueiro VC, Iorio NL, Ferreira MC, Chamon RC, Dos Santos KR. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal Staphylococcus epidermidis isolated from neonates. BMC Microbiol. 2017 Jan 13; 17 (1): 15.
5. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 2014 Oct; 27 (4): 870–926.
6. Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS Program results for 2011. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Jun; 76 (2): 206–13.
7. Mendes RE, Deshpande LM, Costello AJ, Farrell DJ. Molecular epidemiology of Staphylococcus epidermidis clinical isolates from U.S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Sep; 56 (9): 4656–61.
8. McManus BA, Coleman DC, Deasy EC, Brennan GI, O'Connell B, Monecke S, et al. Comparative genotypes, staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) genes and antimicrobial resistance amongst Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus isolates from infections in humans and companion animals. PLoS One. 2015 Sep 17; 10 (9): e0138079.
9. Dubodelov DV, Lyubasovskaya LA, Schubina ES, Mukosey IS, Korostin DO, Kochetkova TO, et al. Genetic determinants of resistance to beta-lactame antibiotics for Klebsiella pneumoniae clinical strains isolated from newborns. Russ J Genet. 2016; 52: 993–8.
10. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol. 2012 Apr; 50 (4): 1355–61.
11. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial

resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012 Nov; 67 (11): 2640–4.
12. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. Nucleic Acids Res. 2013 Jan; 41 (Database issue): D36–42.
13. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215 (3): 403–10.
14. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. J Clin Microbiol. 2004 Dec; 42 (12): 5614–9.
15. Thomas JC, Zhang L, Robinson DA. Differing lifestyles of Staphylococcus epidermidis as revealed through Bayesian clustering of multilocus sequence types. Infect Genet Evol. 2014 Mar; 22: 257–64.
16. Rogers KL, Rupp ME, Fey PD. The presence of icaADBC is detrimental to the colonization of human skin by Staphylococcus epidermidis. Appl Environ Microbiol. 2008 Oct; 74 (19): 6155–7.
17. Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, Wen Y, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of Staphylococcus epidermidis. J Hosp Infect. 2005 Dec; 61 (4): 342–8.
18. Conlan S, Mijares LA; NISC Comparative Sequencing Program, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, et al. Staphylococcus epidermidis pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. Genome Biol. 2012 Jul 25; 13 (7): R64.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *DTXR* У СОВРЕМЕННЫХ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

И. А. Чагина[1], Ю. С. Переварова[2], В. В. Переваров[2], А. В. Чаплин[2] ✉, О. Ю. Борисова[1,2], Л. И. Кафарская[2], С. С. Афанасьев[1], В. А. Алешкин[1]

[1] Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского, Москва

[2] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Считается, что патогенез *Corynebacterium diphtheriae* основан на воздействии дифтерийного токсина на синтез белка в клетках человека. Регуляция синтеза токсина находится под контролем белка DtxR. Данный белок осуществляет железоопосредованную репрессию гена дифтерийного токсина, а также координирует работу множества других генов, необходимых для нормальной жизнедеятельности *C. diphtheriae*. Ген, кодирующий DtxR, можно использовать для анализа популяционной структуры вида, так как он присутствует в геноме как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов. В работе было изучено 45 штаммов *C. diphtheriae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2010–2015 гг. Анализ этих штаммов показал, что ген *dtxR* обнаруживается у всех представителей вида и является высококонсервативным участком генома *C. diphtheriae*. Большинство выявленных полиморфизмов были синонимичны (16 из 18 однонуклеотидных замен). Несмотря на низкий уровень филогенетического сигнала, аллельный вариант *dtxR* был ассоциирован с биологическими признаками штамма (биовар, токсигенность). Полученные данные свидетельствуют о высокой активности отрицательного отбора, направленного на поддержание в популяции существующей последовательности белка, и позволяют рекомендовать наработку фрагментов гена *dtxR* методом полимеразной цепной реакции в качестве дополнительного метода идентификации возбудителя, что особенно актуально в условиях растущего числа заболеваний, ассоциированных с нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae.*

Ключевые слова: дифтерия, *Corynebacterium diphtheriae*, *dtxR*, мультилокусное сиквенс-типирование, металлорегуляторные белки

Финансирование: исследование выполнено в рамках Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» по проектам № А16-116021550311-2 «Изучение роли микробиоценозов ротоглотки и крови человека при дифтерии, коклюше и других инфекционно-воспалительных заболеваниях» и № АААА-А16-116101810127-7 «Разработка молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша».

✉ **Для корреспонденции:** Чаплин Андрей Викторович
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; okolomedik@gmail.com

Статья получена: 02.02.2017 **Статья принята к печати:** 18.02.2017

POLYMORPHISM OF THE *DTXR* GENE IN THE CURRENTLY EXISTING STRAINS OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Chagina IA[1], Perevarova YuS[2], Perevarov VV[2], Chaplin AV[2] ✉, Borisova OYu[1,2], Kafarskaia LI[2], Afanas'ev SS[1], Aleshkin VA[1]

[1]G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

[2]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The pathogenic mechanism used by *Corynebacterium diphtheriae* is attributed to the ability of the diphtheria toxin to disrupt protein synthesis in human cells. Diphtheria toxin production is regulated by the DtxR protein. The latter is involved in the iron-mediated repression of the toxin gene and coordinates activities of other genes essential for the survival of *C. diphtheriae*. The DtxR-encoding gene occurs in both toxigenic and non-toxigenic strains; therefore it can be used to analyze the population structure of the species. In our work we have studied 45 strains of *C. diphtheriae* isolated in the Russian Federation in 2010–2015. These strains were analyzed to reveal that gene *dtxR* is a highly conservative region of *C. diphtheriae* genome that can be found in all members of the studied species. The majority of the discovered polymorphisms were synonymous (16 of 18 single nucleotide polymorphisms identified). In spite of the low phylogenetic signal, the allelic variant of *dtxR* was associated with the strain's phenotype (biovar, toxigenicity). The obtained data indicate the presence of aggressive negative selection aimed to maintain the existing protein sequence in the population. Based on the results, we recommend *dtxR* polymerase chain reaction as an additional technique for pathogen identification, which is especially relevant considering the increasing prevalence of the disease associated with non-toxigenic *C. diphtheriae* strains.

Keywords: diphtheria, *Corynebacterium diphtheriae*, *dtxR*, multilocus sequence typing, metalloregulatory proteins

Funding: this study was conducted as part of two projects: *The Study of the Role of Microbial Communities in Human Oropharynx and Blood in Diphtheria, Pertussis and Other Infectious Inflammatory Diseases* (Project ID A16-116021550311-2) and *The Development of Molecular-Genetic Methods for Laboratory Diagnosis of Diphtheria and Pertussis* (Project ID AAAA-A16-116101810127-7) supported by the Sectoral Research Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (*Problem-oriented Research in Epidemiological Surveillance of Infectious and Parasitic Diseases in 2016-2020*).

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrei Chaplin
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; okolomedik@gmail.com

Received: 02.02.2017 **Accepted:** 18.02.2017

Дифтерия, несмотря на эффективность вакцинопрофилактики, остается актуальной инфекцией в условиях спорадической заболеваемости и циркуляции возбудителя среди населения. Способность *Corynebacterium diphtheriae* вызывать дифтерию ассоциирована с выработкой дифтерийного токсина, последовательность которого кодируется геном *tox* [1]. Механизм действия дифтерийного токсина основан на АДФ-рибозилировании фактора элонгации 2, что приводит к нарушению синтеза белка в клетках человека [2]. Стоит отметить, что наличие *tox* в геноме *C. diphtheriae* не всегда свидетельствует о токсигенности штамма. Отдельного рассмотрения требуют нетоксигенные *tox*-несущие штаммы (НТТН-штаммы), которые в результате различных мутационных событий потеряли способность синтезировать полноценный токсин [3, 4].

Несмотря на то, что *tox* является частью генома коринефага, железоопосредованная репрессия дифтерийного токсина осуществляется металлорегуляторным белком DtxR — продуктом хромосомного гена *dtxR*. Таким образом, транскрипция *tox* непосредственно связана с гомеостазом железа, низкая концентрация которого индуцирует экспрессию данного гена и, соответственно, синтез дифтерийного токсина [5].

Ген *dtxR* присутствует у токсигенных и нетоксигенных штаммов [6], что свидетельствует о наличии у него других функций помимо регуляции синтеза дифтерийного токсина. Согласно исследованиям, регулон DtxR может включать еще 20 локусов, в том числе гены, ответственные за усвоение железа. Так, на сегодняшний день известно, что у *C. diphtheriae* посредством DtxR регулируется синтез сидерофоров и высокоаффинная транспортная система (ciuABCDEFG), транскрипция трех локусов, вовлеченных в работу гем-монооксигеназы (*hmuO*) [1, 7]. Возможна также дополнительная роль DtxR в регуляции вирулентности [7].

Железо, которое не является легкодоступным элементом, необходимо микроорганизмам в больших количествах. В то же время его избыток приводит к образованию токсичных активных форм кислорода. Уменьшение концентрации свободного железа в организме млекопитающего представляет собой один из эволюционно сложившихся механизмов неспецифической противоинфекционной защиты и достигается путем связывания этого металла специфическими белками [8, 9].

Выживание и распространение патогена в организме хозяина, таким образом, становится зависимым и от его способности усваивать различные ионы металлов из комплексов с белками. Для этого существуют разные системы захвата, кодируемые генами. Экспрессию генов контролируют металлорегуляторные белки — высококонсервативные регуляторы транскрипции [10, 11]. Такие транскрипционные факторы при связывании со специфичным ионом металла претерпевают конформационные изменения, в результате чего происходит активация или угнетение связывания активного центра с оператором регулируемого гена [12].

DtxR является одним из классических представителей металлорегуляторных белков. Кристаллографические исследования показывают, что в неактивном состоянии DtxR представляет собой мономер, который состоит из двух доменов: большой консервативный N-концевой домен содержит два сайта связывания для иона железа, а также мотив спираль–поворот–спираль (helix–turn–helix), способный взаимодействовать с ДНК; малый менее консервативный С-концевой домен имеет сходство с SH3-доменами эукариот. При соединении ионов железа с каждым из сайтов связывания происходит активация репрессора с последующей его димеризацией [13].

Два домена DtxR соединяются между собой посредством богатого пролином пептидного сегмента. При неактивном состоянии репрессора данный участок связывается с SH3-подобным доменом, что приводит к образованию комплекса пролилпептид–SH3 (Pr-SH3). Таким образом происходит стабилизация неактивного состояния репрессора. При активации DtxR посредством специфического связывания железа N-концевым доменом комплекс Pr-SH3 диссоциирует, после чего пролиновый сегмент стабилизирует спирали N-концевого домена, что приводит к димеризации двух субъединиц белка [14].

Учитывая значимость DtxR для *C. diphtheriae*, молекулярно-генетическое исследование кодирующего его гена *dtxR* позволит более подробно изучить патогенный потенциал *C. diphtheriae*, особенности формирования популяции циркулирующих штаммов в эволюционном развитии данного вида, а также оценить возможность использования *dtxR* в качестве мишени при ПЦР-диагностике дифтерии и инфекций, ассоциированных с нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae*. В связи с этим целью данной работы являлось определение генетического полиморфизма DtxR и последующий анализ структуры популяции штаммов *C. diphtheriae*, циркулирующих на территории России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучены генотипические свойства 45 штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в 2010–2015 гг. и относящихся к биоварам gravis и mitis. Штаммы *C. diphtheriae* были присланы в Референс-центр по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского из бактериологических лабораторий лечебно-профилактических организаций и Центров гигиены и эпидемиологии 14 регионов Российской Федерации. Исследованные в работе штаммы выделялись с диагностической, с профилактической целями или по эпидемическим показаниям. В работе использованы коллекционные штаммы: *C. diphtheriae* 178-01 (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), *C. diphtheriae* PW 8 (НЦЭСМП, Москва, Россия). Помимо этого, в качестве отрицательного контроля для ПЦР в работу включили по 1 штамму *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. amycolatum*, *C. glucuronolyticum*, *C. xerosis*, *C. afermentans subsp. afermentans*, *C. afermentans subsp. lipophilum*, *C. coyleae*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. macifaciens*, *C. simulans*, *C. durum* из рабочей коллекции МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского.

Выделение штаммов *C. diphtheriae* проводили согласно методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Исследуемый материал засевали на кровяно-теллуритовую среду на основе 2 % сухого питательного агара («Микроген», Россия) с 10 % крови крупного рогатого скота («ЛейТран», Россия) и 0,02 % теллурита калия (ГНЦ ПМБ, Россия) и термостатировали 24–48 ч при 37 °С. Выросшие колонии оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам согласно МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13, а акже с использованием биохимической тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Россия).

Хромосомную ДНК выделяли методом кипячения из 24-часовой культуры *C. diphtheriae*, выросшей на 2 %

сухом питательном агаре с добавлением 10 % крови крупного рогатого скота. Петлю суточной культуры суспендировали в 100 мкл деионизованной воды, инкубировали 20 мин при 95 °С и подвергали центрифугированию, полученный супернатант использовали для проведения ПЦР.

ПЦР для амплификации гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae* проводили с использованием одной пары праймеров, охватывающей всю область гена *dtxR*: ранее предложенного F_1 5'-GGGACTACAACGCAACAAGAA-3' [15] и R_1 5'-TCATCTAATTTCGCCGCCTTTA-3', подобранного с использованием приложения PerlPrimer v1.1.21 [16]. Видовая специфичность используемых праймеров была проверена путем поиска схожих последовательностей у других видов рода *Corynebacterium* в базе данных NCBI Nucleotide с помощью программы BLASTn.

Реакционная смесь содержала ПЦР-буфер с 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкл раствора ДНК, 1 е. а. Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва) в объеме 50 мкл. Амплификация фрагментов гена выполнялась в автоматическом режиме на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Детекцию результатов амплификации проводили путем электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Наработанные фрагменты нуклеотидных последовательностей подвергали последующему секвенированию в компании «Евроген» (Россия).

Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* проводили с помощью мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) согласно международному протоколу [17] на основе секвенирования фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства» (house-keeping genes): *atpA* (кодирует α-субъединицу АТФ-синтазы), *dnaE* (кодирует α-субъединицу холофермента ДНК полимеразы III), *dnaK* (кодирует шаперон Hsp70), *fusA* (кодирует фактор элонгации G), *leuA* (кодирует 2-изопропилмалатсинтазу), *odhA* (кодирует компоненты E1 и E2 комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы) и *rpoB* (кодирует β-субъединицу РНК-полимеразы) — с последующей идентификацией аллельного профиля каждого штамма.

Результаты секвенирования сопоставляли с опубликованными в международной базе данных генотипов GenBank нуклеотидными последовательностями генов. В качестве референса использовали последовательность *dtxR* из генома *C. diphtheriae* PW8 (идентификатор доступа: Genbank NC_016789.1).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE [18]. Положение полиморфизмов относительно структурных элементов белка анализировали по базе данных PDB. Поиск в базе данных NCBI Nucleotide осуществляли с помощью программы BLASTn. Для идентификации аллелей генов «домашнего хозяйства» *C. diphtheriae* использовали программное обеспечение международной базы данных PubMLST. Для оценки мутационного отбора гена *dtxR* рассчитывали индекс K_a/K_s — отношение количества синонимичных (K_s) и несинонимичных (K_a) замен на сайт последовательности — с использованием метода Nei–Gojobori [19]. Точный критерий Фишера для таблиц сопряженности произвольного размера рассчитывали с использованием алгоритма AS159 [20] с помощью R 3.3.2. Реконструкция филогении осуществлялась методом присоединения соседей (neighbor-joining) на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена *dtxR*. Для построения филогенетического дерева *dtxR* исследованных штаммов помимо *C. diphtheriae* PW8 были использованы нуклеотидные последовательности *C. diphtheriae* NCTC 13129 и *C. diphtheriae* 178-01 (идентификаторы доступа: Genbank NC_016789.1, BX248353.1 и NZ_JZUJ01000001.1). Эволюционные расстояния были вычислены с использованием MCL-метода (Maximum Composite Likelihood method) [21] в единицах количества замен оснований, приходящихся на сайт. Эволюционные анализы проводили в программе MEGA7 v.7.0.21 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В поставленных ПЦР ген *dtxR* выявлен в 100 % случаев как у токсигенных, так и у нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*. Кроме того, результат ПЦР у всех проверенных штаммов родственных видов в 100 % случаев был отрицательным.

В результате секвенирования образцов и сопоставления с опубликованными в базе данных GenBank последовательностями гена *dtxR* у изученных 45 штаммов *C. diphtheriae* нами были выявлены полиморфизмы в 18 позициях гена: 66, 126, 225, 273, 358, 402, 440, 474, 504, 507, 516, 558, 564, 579, 639, 640, 654 и 685 (табл. 1).

Большинство замен нуклеотидов относительно референсной последовательности *dtxR* оказались синонимичными. В частности, наиболее распространенная однонуклеотидная замена в 273 позиции гена *dtxR*, обнаруженная у 14 из 45 изученных штаммов *C. diphtheriae*, не влияла на последовательность белка.

Выявленные полиморфизмы в положениях 440 и 640, приводящие к заменам A147V и L214I соответственно, предположительно, не оказывают значительного влияния на функцию DtxR. В соответствии с трехмерной структурой белка, опубликованной в базе данных PDB (идентификатор 2QQ9), аминокислотная позиция 147 расположена в неструктурированном богатом пролином (Pr) участке. Т. к. этот сегмент участвует в димеризации белка, нельзя исключать, что аминокислотная замена в нем может повлиять на процесс активации DtxR. Замена лейцина на изолейцин в положении 214, находящемся в С-концевом домене белка, предположительно, также не влияет на фолдинг белка, т. к. данные аминокислоты обладают схожими свойствами. Таким образом, выявленные несинонимичные замены с высокой вероятностью не влияют на функцию DtxR.

Многие из вариантов последовательностей были описаны ранее, но нами впервые обнаружен однонуклеотидный полиморфизм в положении 358, также не затрагивающий аминокислотную последовательность. При поиске в базе данных NCBI Nucleotide с помощью программы BLASTn такой вариант замены нуклеотида обнаружен не был.

Полиморфизмы в гене *dtxR* относительно референсной последовательности у штаммов *C. diphtheriae* встречались в различных комбинациях. Согласно выявленным сочетаниям нуклеотидных замен исследованные изоляты были разделены на группы (табл. 2).

Более половины (55 %) нуклеотидных последовательностей были отличны от референса. Стоит отметить, что впервые выявленная замена в положении 358 обнаружена у единственного штамма, отнесенного к группе 5, который, кроме того, имеет наибольшее количество замен относительно референсной последовательности, в том числе несинонимичных.

На основании полученного выравнивания последовательностей *dtxR* была построена дендрограмма филогенетических взаимоотношений (рисунок).

Таблица 1. Частота встречаемости замен нуклеотидов в гене *dtxR* у исследованных штаммов *C. diphtheriae* относительно штамма PW8

Положение нуклеотида в гене *dtxR*	Замена нуклеотидов	Кодируемая аминокислота	Замена аминокислоты	Число штаммов
66	A–T	22	–	5
126	C–T	42	–	5
225	T–C	75	–	6
273	C–T	91	–	14
358	T–C	120	–	1
402	T–A	134	–	1
440	C–T	147	Аланин (A)–Валин (V)	6
474	C–T	158	–	6
504	T–A	168	–	6
507	C–T	169	–	6
516	T–C	172	–	6
558	C–T	186	–	2
564	T–A	188	–	6
579	C–T	193	–	2
639	C–T	213	–	4
640	C–A	214	Лейцин (L)–Изолейцин (I)	2
654	T–C	218	–	2
685	C–T	229	–	1

Таблица 2. Комбинации полиморфизмов гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheria*

Группа штаммов	Число штаммов (n = 45)	Положение нуклеотида в нуклеотидной последовательности *dtxR*																	
		66	126	225	273	358	402	440	474	504	507	516	558	564	579	639	640	654	685
1	20 (44 %)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	5 (11 %)	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	9 (20 %)	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	5 (11 %)	*	*	C	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*
5	1 (2 %)	*	*	C	*	C	A	**T**	T	A	T	C	T	A	T	T	**A**	C	T
6	1 (2 %)	T	*	*	*	*	*	**T**	T	A	T	C	T	A	T	T	**A**	C	*
7	4 (9 %)	T	*	*	*	*	*	**T**	T	A	T	C	*	A	*	*	*	*	*
Референсный штамм PW8	–	A	C	T	C	T	T	C	C	T	C	T	C	T	C	C	C	T	C

Примечание. * — совпадение нуклеотида; **T**, **A** — полиморфизм с заменой аминокислоты.

Реконструкция порядка ветвления в значительной степени условна, что связано с большим сходством анализируемых последовательностей и, следовательно, низким уровнем филогенетического сигнала. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений изучаемых штаммов представлена без укоренения дерева в связи с невозможностью подобрать подходящую внешнюю группу.

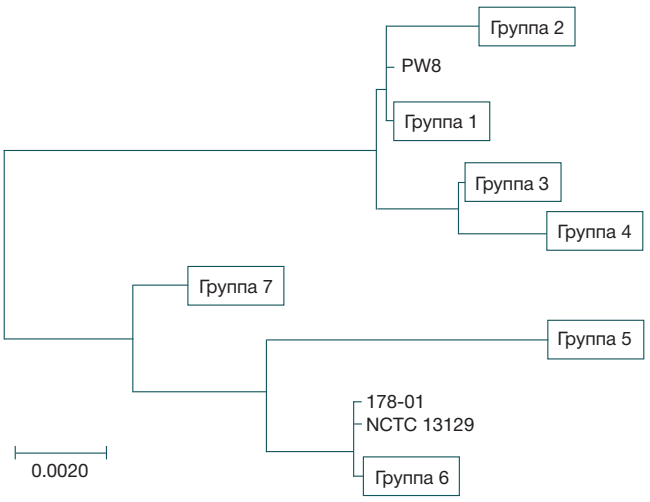
При более подробном изучении были проанализированы соотношения состава групп с такими параметрами, как токсигенность, принадлежность к определенному биовару и сиквенс-тип (ST) по МЛСТ (табл. 3). Данные о принадлежности штаммов НТТН описаны в работе [23].

На основании данных о распределении относительно каждого аллеля *dtxR* токсигенных и нетоксигенных штаммов различных биоваров был проведен точный тест Фишера. Тест выполняли в таблицах сопряженности 2 × 7 для распределения биовара относительно варианта аллеля *dtxR* ($p = 0{,}00078$) и 3 × 7 для распределения токсигенности относительно варианта аллеля *dtxR* ($p = 2{,}8 \cdot 10^{-9}$). Полученные результаты позволяют утверждать, что распределение таких признаков, как биовар и токсигенность, относительно варианта аллеля *dtxR* не является случайным, что свидетельствует о наличии филогенетического сигнала, который складывается из взаимосвязей между аллельным вариантом *dtxR* и биологическими признаками штаммов. Распределение по сиквенс-типу оказалось неоднородным, одинаковые сиквенс-типы в большинстве случаев не встречались в разных группах.

Для оценки мутационного отбора гена *dtxR* в отношении сделанного выравнивания был произведен расчет индекса K_a/K_s, который составил 0,0526. Полученное значение индекса ($K_a/K_s < 1$) свидетельствует о выраженном отрицательном отборе, т. е. давление естественного отбора направлено на сохранение существующей последовательности белка [24].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование подтвердило важную роль DtxR в жизнедеятельности *C. diphtheriae* как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов. Обнаруженные полиморфизмы предоставляют новую информацию о современной изменчивости *C. diphtheriae* на территории России.



Дендрограмма филогенетических взаимоотношений гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae*

Дерево изображено в масштабе, с длинами ветвей в тех же эволюционных расстояниях, которые использовались для построения филогенетического дерева. Масштаб соответствует 0,1 замене на 200 п. н. Последовательности внутри групп полностью идентичны.

Аллельные варианты *dtxR* на уровне нуклеотидных и аминокислотных последовательностей изучались ранее при разной интенсивности эпидемического процесса дифтерии [25–27]. В данной работе в условиях спорадической заболеваемости проводился комплексный анализ нуклеотидных последовательностей в соотнесении их с такими свойствами штамма, как токсигенность, принадлежность к определенному биовару и сиквенс-типу. Такой подход позволил нам на основании полученных данных глубже исследовать структуру популяции современных штаммов *C. diphtheriae*.

Предположение о значительном влиянии горизонтального переноса генов на формирование популяции *C. diphtheriae* высказывалось и ранее [17]. Так, описаны механизмы переноса генов, ответственных за антибиотикоустойчивость [28] и факторы патогенности [29]. Состав DtxR-регулона в различных штаммах *C. diphtheriae* также может изменяться вследствие получения, утраты, частичной делеции генов, оказывающих влияние на обеспечение бактериальной клетки железом и, следовательно, на экспрессию гена *tox* [1, 30]. Обнаруженная нами взаимосвязь между сиквенс-типом и аллелем *dtxR* подтверждает ранее высказанную идею, что наличие гомологичной рекомбинантной изменчивости у *C. diphtheriae* не перекрывает полностью филогенетический сигнал [17]. В то же время проведенный нами анализ структуры популяции *C. diphtheriae* не показал прямого соответствия между биоваром и аллелем *dtxR*, что подтверждает отсутствие филогенетической основы данной классификации, обусловленное, предположительно, распространенностью горизонтального переноса генов [31].

Сравнение последовательностей *dtxR* исследуемых штаммов показало, что менее половины (45 %) из них идентичны референсной. Из 18 полиморфизмов лишь один был выявлен впервые (позиция 358), однако он не затрагивал аминокислотную последовательность. Наиболее распространенным был синонимичный полиморфизм в позиции 273 гена *dtxR*, который встречался у 14 штаммов *C. diphtheriae*. В сравнении с другими работами современные штаммы, выделенные на территории РФ, обладают относительно малым разнообразием вариантов первичной структуры DtxR [26, 27].

Стоит отметить, что, хотя *dtxR* влияет на устойчивость бактерий к оксидативному стрессу, он не является жизненно важным геном для *C. diphtheriae* в обычных условиях [32], что подтвердил эксперимент с мутантным штаммом с нарушенной функцией DtxR [33]. Тем не менее в изученных последовательностях значимых изменений, которые могли бы привести к синтезу функционально неактивного белка, обнаружено не было. Два повторно выявленных однонуклеотидных полиморфизма действительно приводили к замене аминокислот, однако данные изменения согласно анализу структур, представленных в базе данных PDB, предположительно, не оказали влияния на фолдинг белка. Вероятно, функционально значимые полиморфизмы в гене *dtxR* снижают приспособленность штаммов к существованию внутри организма млекопитающего, таким образом ограничивая распространение в популяции *C. diphtheriae* аллелей, приводящих к синтезу дефектного белка. Предположение о том, что DtxR находится под контролем стабилизирующего отбора подтверждает полученное значение индекса K_a/K_s.

Реализация патогенного потенциала *C. diphtheriae* не всегда связана со способностью штамма к выработке дифтерийного токсина. Так, нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* в настоящее время стали чаще являться причиной серьезных заболеваний, в частности, эндокардитов [34], артритов [35] и остеомиелитов [36]. Особую

Таблица 3. Состав групп в соответствии с комбинацией полиморфизмов в гене *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae*

Группа	Количество замен в гене *dtxR* относительно штамма PW8	Число штаммов	Биовар (число штаммов)	Токсигенность (число штаммов)	Сиквенс-тип
1	–	20	mitis (18), gravis (2)	нетоксигенные (15)	*
				НТТН-штаммы (3)	76
				токсигенные (2)	5, 46
2	1	5	mitis	НТТН-штаммы	40
3	1	9	gravis (1), mitis (8)	токсигенные (8)	25
				нетоксигенные (1)	123
4	3	5	mitis	токсигенные	28, 67
5	15	1	mitis	нетоксигенный	–
6	12	1	gravis	токсигенный	8
7	7	4	gravis	токсигенные	8

Примечание. * — МЛСТ не проводили, – — ST не обнаружен в базе данных.

опасность нетоксигенные штаммы представляют для иммунокомпрометированных лиц [37, 38]. Данный факт требует расширения подходов к идентификации *C. diphtheriae*, т. к. существующие методы в большинстве случаев ориентированы на выявление токсигенных штаммов.

Проведенные нами исследования подтвердили наличие *dtxR* в геноме токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, что позволяет говорить о практической ценности ПЦР-идентификации *C. diphtheriae*, предложенной ранее [39]. Последующее секвенирование показало преимущественное расположение полиморфизмов в части последовательности, соответствующей С-концевому домену DtxR [15]. Тем не менее варианты замен нуклеотидов, в том числе впервые выявленный, встречались и в других частях гена (позиции 66, 126, 225, 273, 358). Одна из таких замен (позиция 126), обнаруженная у 5 штаммов (группа 2), находилась в области праймера, предложенного для ПЦР-*dtxR* в нескольких других работах [15, 39]. Апробированная в данном исследовании пара праймеров обладала высокой специфичностью, что подтверждено отсутствием ложноположительных результатов. Таким образом, идентификация *C. diphtheriae* методом ПЦР представляет собой перспективное направление в диагностике дифтерии и инфекций, ассоциированных с нетоксигенными штаммами.

ВЫВОДЫ

В исследовании проведен анализ структуры популяции *C. diphtheriae*, основанный на вариантах аллеля гена *dtxR*. Отличными от референсной последовательности *dtxR* оказались 55 % штаммов, при этом большинство обнаруженных однонуклеотидных полиморфизмов было синонимичным. Отсутствие в исследованиях диких штаммов с нарушенной продукцией DtxR и высокое сходство анализируемых нуклеотидных последовательностей позволяет говорить о высокой активности отрицательного отбора, направленного на поддержание в популяции существующей последовательности репрессора дифтерийного токсина.

Наличие гомологичной рекомбинантной изменчивости действительно снижает уровень филогенетического сигнала, но не перекрывает его полностью. В результате проведенной работы были обнаружены определенные ассоциации между аллельными вариантами *dtxR* и такими параметрами, как токсигенность и принадлежность к биовару.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что *dtxR* является консервативной последовательностью, и рекомендовать детекцию продуктов ПЦР *dtxR* как точный метод идентификации токсигенных и в особенности нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Литература

1. Trost E, Blom J, Soares S de C, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, et al. Pangenomic study of Corynebacterium diphtheriae that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. J Bacteriol. 2012 Jun; 194 (12): 3199–215.
2. Deng Q, Barbieri JT. Molecular Mechanisms of the Cytotoxicity of ADP-Ribosylating Toxins. Annu Rev Microbiol. 2008; 62 (1): 271–88.
3. Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Мельников В. Г., Наумов Л. С., Нарвская О. В., Мокроусов И. В. и др. Наблюдение за циркуляцией штаммов Corynebacterium diphtheriae, различающихся по признаку токсигенности. Мед. альманах. 2009; (2): 108–11.
4. Мельников В. Г., Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Воложенцев Н. В., Веревкин В. В., Волковой К. И. и др. Характеристика нетоксигенных штаммов Corynebacterium diphtheriae, несущих ген дифтерийного токсина. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; (1): 3–7.
5. Merchant AT, Spatafora GA. A role for the DtxR family of metalloregulators in gram-positive pathogenesis. Mol Oral Microbiol. 2014 Feb; 29 (1): 1–10.
6. Dinu S, Damian M, Badell E, Dragomirescu CC, Guiso N. New diphtheria toxin repressor types depicted in a Romanian collection of Corynebacterium diphtheriae isolates. J Basic Microbiol. 2014 Oct; 54 (10): 1136–9.
7. Yellaboina S, Ranjan S, Chakhaiyar P, Hasnain SE, Ranjan A. Prediction of DtxR regulon: identification of binding sites and operons controlled by Diphtheria toxin repressor in Corynebacterium diphtheriae. BMC Microbiol. 2004 Sep 24; 4: 38.
8. Agranoff DD, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. Mol Microbiol. 1998 May; 28 (3): 403–12.
9. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. Curr Med Chem. 2005; 12 (10): 1161–208.
10. Rolerson E, Swick A, Newlon L, Palmer C, Pan Y, Keeshan B, et al. The SloR/Dlg metalloregulator modulates Streptococcus mutans virulence gene expression. J Bacteriol. 2006 Jul; 188 (14): 5033–44.
11. Reyes-Caballero H, Campanello GC, Giedroc DP. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. Biophys Chem. 2011 Jul; 156 (2–3): 103–14.
12. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Lewin's Genes XI. 11th ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning; 2014.
13. D'Aquino JA, Ringe D. Mechanism of metal ion activation of the diphtheria toxin repressor DtxR. AIP Conf Proc. 2006; 851: 196–8.
14. Bhattacharya N, Yi M, Zhou HX, Logan TM. Backbone Dynamics in an Intramolecular Prolylpeptide-SH3 Complex from the Diphtheria Toxin Repressor, DtxR. J Mol Biol. 2007 Dec 7; 374 (4): 977–92.
15. Nakao H, Mazurova IK, Glushkevich T, Popovic T. Analysis of heterogeneity of Corynebacterium diphtheriae toxin gene, tox, and its regulatory element, dtxR, by direct sequencing. Res Microbiol. 1997 Jan; 148 (1): 45–54.
16. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. Bioinformatics. 2004 Oct 12; 20 (15): 2471–2.
17. Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of Corynebacterium diphtheriae. J Clin Microbiol. 2010 Nov; 48 (11): 4177–85.
18. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004 Mar 19; 32 (5): 1792–7.
19. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol Biol Evol. 1986 Sep; 3 (5): 418–26.
20. Patefield WM. Algorithm AS 159: An Efficient Method of Generating Random R × C Tables with Given Row and Column Totals. J R Stat Soc Ser C Appl Stat. 1981; 30 (1): 91–7.
21. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 27; 101 (30): 11030–5.
22. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul; 33 (7): 1870–4.
23. Борисова О. Ю., Чагина И. А., Чаплин А. В., Комбаро-

ва С. Ю., Кафарская Л. И., Алешкин В. А. Особенности структуры гена tox, кодирующего дифтерийный токсин штаммов Corynebacterium diphtheriae, выделенных в России в 2010–2015 гг. Инфек. бол. 2015; 13 (3): 12–7.
24. Yang Z, Bielawski JP. Statistical methods for detecting molecular adaptation. Trends Ecol Evol. 2000 Dec 1;15(12):496-503.
25. Комбарова С. Ю., Мазурова И. К., Мельников В. Г., Костюкова Н. Н., Волкова К. И., Борисова О. Ю. и др. Генетическая структура штаммов Corynebacterium diphtheriae, выделенных в России при разной интенсивности эпидемического процесса дифтерии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; (3): 3–8.
26. De Zoysa A, Efstratiou A, Hawkey PM. Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (dtxR) genes present in nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae strains isolated in the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2005 Jan; 43 (1): 223–8.
27. Комбарова С. Ю., Борисова О. Ю., Мельников В. Г., Губина Н. И., Лосева Л. В., Мазурова И. К. Полиморфизм генов tox и dtxR у циркулирующих штаммов Corynebacterium diphtheriae. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; (1): 7–11.
28. Serwold-Davis TM, Groman N, Rabin M. Transformation of Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium glutamicum, and Escherichia coli with the C. diphtheriae plasmid pNG2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jul; 84 (14): 4964–8.
29. Sangal V, Blom J, Sutcliffe IC, von Hunolstein C, Burkovski A, Hoskisson PA. Adherence and invasive properties of Corynebacterium diphtheriae strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. BMC Genomics. 2015 Oct 9; 16: 765.
30. Drazek ES, Hammack CA, Schmitt MP. Corynebacterium diphtheriae genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. Mol Microbiol. 2000 Apr; 36 (1): 68–84.
31. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important Corynebacterium diphtheriae from whole genome sequencing. Infect Genet Evol. 2014 Jan; 21: 54–7.
32. Oram DM, Avdalovic A, Holmes RK. Construction and characterization of transposon insertion mutations in Corynebacterium diphtheriae that affect expression of the diphtheria toxin repressor (DtxR). J Bacteriol. 2002 Oct; 184 (20): 5723–32.
33. Boyd JM, Hall KC, Murphy JR. DNA sequences and characterization of dtxR alleles from Corynebacterium diphtheriae PW8(-), 1030(-), and C7hm723(-). J Bacteriol. 1992 Feb; 174 (4): 1268–72.
34. Muttaiyah S, Best EJ, Freeman JT, Taylor SL, Morris AJ, Roberts SA. Corynebacterium diphtheriae endocarditis: A case series and review of the treatment approach. Int J Infect Dis. 2011 Sep; 15 (9): e584–8.
35. Barakett V, Morel G, Lesage D, Petit JC. Septic arthritis due to a nontoxigenic strain of Corynebacterium diphtheriae subspecies mitis. Clin Infect Dis. 1993 Sep; 17 (3): 520–1.
36. Farfour E, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, et al. Characterization and comparison of invasive Corynebacterium diphtheriae isolates from France and Poland. J Clin Microbiol. 2012 Jan; 50 (1): 173–5.
37. Lake JA, Ehrhardt MJ, Suchi M, Chun RH, Willoughby RE. A Case of Necrotizing Epiglottitis Due to Nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae. Pediatrics. 2015 Jul; 136 (1): e242–5.
38. Wojewoda CM, Koval CE, Wilson DA, Chakos MH, Harrington SM. Bloodstream Infection Caused by Nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae in an Immunocompromised Host in the United States. J Clin Microbiol. 2012 Jun; 50 (6): 2170–2.
39. Pimenta FP, Matias GA, Pereira GA, Camello TC, Alves GB, Rosa AC, et al. A PCR for dtxR gene: Application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic Corynebacterium diphtheriae. Mol Cell Probes. 2008 Jun; 22 (3): 189–92.

References

1. Trost E, Blom J, Soares S de C, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, et al. Pangenomic study of Corynebacterium diphtheriae that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. J Bacteriol. 2012 Jun; 194 (12): 3199–215.
2. Deng Q, Barbieri JT. Molecular Mechanisms of the Cytotoxicity of ADP-Ribosylating Toxins. Annu Rev Microbiol. 2008; 62 (1): 271–88.
3. Kombarova SU, Borisova OU, Melnikov VG, Naumov LS, Narvskaya OV, Mokrousov IV, et al. [Observation of circulation of Corynebacterium diphtheriae strains differing in toxigenicity character]. Meditsinskii al'manakh. 2009; (2): 108–11. Russian.
4. Mel'nikov VG, Kombarova SIu, Borisova OIu, Volozhantsev NV, Verevkin VV, Volkovoj KI, et al. [Corynebacterium diphtheriae nontoxigenic strain carrying the gene of diphtheria toxin]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2004 Jan–Feb; (1): 3–7. Russian.
5. Merchant AT, Spatafora GA. A role for the DtxR family of metalloregulators in gram-positive pathogenesis. Mol Oral Microbiol. 2014 Feb; 29 (1): 1–10.
6. Dinu S, Damian M, Badell E, Dragomirescu CC, Guiso N. New diphtheria toxin repressor types depicted in a Romanian collection of Corynebacterium diphtheriae isolates. J Basic Microbiol. 2014 Oct; 54 (10): 1136–9.
7. Yellaboina S, Ranjan S, Chakhaiyar P, Hasnain SE, Ranjan A. Prediction of DtxR regulon: identification of binding sites and operons controlled by Diphtheria toxin repressor in Corynebacterium diphtheriae. BMC Microbiol. 2004 Sep 24; 4: 38.
8. Agranoff DD, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. Mol Microbiol. 1998 May; 28 (3): 403–12.
9. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. Curr Med Chem. 2005; 12 (10): 1161–208.
10. Rolerson E, Swick A, Newlon L, Palmer C, Pan Y, Keeshan B, et al. The SloR/Dlg metalloregulator modulates Streptococcus mutans virulence gene expression. J Bacteriol. 2006 Jul; 188 (14): 5033–44.
11. Reyes-Caballero H, Campanello GC, Giedroc DP. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. Biophys Chem. 2011 Jul; 156 (2–3): 103–14.
12. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Lewin's Genes XI. 11th ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning; 2014.
13. D'Aquino JA, Ringe D. Mechanism of metal ion activation of the diphtheria toxin repressor DtxR. AIP Conf Proc. 2006; 851: 196–8.
14. Bhattacharya N, Yi M, Zhou HX, Logan TM. Backbone Dynamics in an Intramolecular Prolylpeptide-SH3 Complex from the Diphtheria Toxin Repressor, DtxR. J Mol Biol. 2007 Dec 7; 374 (4): 977–92.
15. Nakao H, Mazurova IK, Glushkevich T, Popovic T. Analysis of heterogeneity of Corynebacterium diphtheriae toxin gene, tox, and its regulatory element, dtxR, by direct sequencing. Res Microbiol. 1997 Jan; 148 (1): 45–54.
16. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. Bioinformatics. 2004 Oct 12; 20 (15): 2471–2.
17. Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of Corynebacterium diphtheriae. J Clin Microbiol. 2010 Nov; 48 (11): 4177–85.
18. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004 Mar 19; 32 (5): 1792–7.
19. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol Biol Evol. 1986 Sep; 3 (5): 418–26.

20. Patefield WM. Algorithm AS 159: An Efficient Method of Generating Random R × C Tables with Given Row and Column Totals. J R Stat Soc Ser C Appl Stat. 1981; 30 (1): 91–7.
21. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 27; 101 (30): 11030–5.
22. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul; 33 (7): 1870–4.
23. Borisova OYu, Chagina IA, Chaplin AV, Kombarova SYu, Kafarskaya LI, Aleshkin VA. [Specificities of the structure of the tox gene encoding diphtheria toxin of Corynebacterium diphtheriae strains isolated in Russia in 2010–2015]. Infektsionnye bolezni. 2015; 13 (3): 12–7. Russian.
24. Yang Z, Bielawski JP. Statistical methods for detecting molecular adaptation. Trends Ecol Evol. 2000 Dec 1;15(12):496-503.
25. Kombarova Slu, Mazurova IK, Mel'nikov VG, Kostiukova NN, Volkovoj KI, Borisova Olu, et al. [Genetic structure of Corynebacterium diphtheriae strains isolated in Russia during epidemics of various intensity]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2001 May–Jun; (3): 3–8. Russian.
26. De Zoysa A, Efstratiou A, Hawkey PM. Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (dtxR) genes present in nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae strains isolated in the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2005 Jan; 43 (1): 223–8.
27. Kombarova Slu, Borisova Olu, Mel'nikov VG, Gubina NI, Loseva LV, Mazurova IK. [Polymorphism of tox and dtxR genes in circulating strains of Corynebacterium diphtheriae]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2009 Jan–Feb; (1): 7–11. Russian.
28. Serwold-Davis TM, Groman N, Rabin M. Transformation of Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium glutamicum, and Escherichia coli with the C. diphtheriae plasmid pNG2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jul; 84 (14): 4964–8.
29. Sangal V, Blom J, Sutcliffe IC, von Hunolstein C, Burkovski A, Hoskisson PA. Adherence and invasive properties of Corynebacterium diphtheriae strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. BMC Genomics. 2015 Oct 9; 16: 765.
30. Drazek ES, Hammack CA, Schmitt MP. Corynebacterium diphtheriae genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. Mol Microbiol. 2000 Apr; 36 (1): 68–84.
31. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important Corynebacterium diphtheriae from whole genome sequencing. Infect Genet Evol. 2014 Jan; 21: 54–7.
32. Oram DM, Avdalovic A, Holmes RK. Construction and characterization of transposon insertion mutations in Corynebacterium diphtheriae that affect expression of the diphtheria toxin repressor (DtxR). J Bacteriol. 2002 Oct; 184 (20): 5723–32.
33. Boyd JM, Hall KC, Murphy JR. DNA sequences and characterization of dtxR alleles from Corynebacterium diphtheriae PW8(-), 1030(-), and C7hm723(-). J Bacteriol. 1992 Feb; 174 (4): 1268–72.
34. Muttaiyah S, Best EJ, Freeman JT, Taylor SL, Morris AJ, Roberts SA. Corynebacterium diphtheriae endocarditis: A case series and review of the treatment approach. Int J Infect Dis. 2011 Sep; 15 (9): e584–8.
35. Barakett V, Morel G, Lesage D, Petit JC. Septic arthritis due to a nontoxigenic strain of Corynebacterium diphtheriae subspecies mitis. Clin Infect Dis. 1993 Sep; 17 (3): 520–1.
36. Farfour E, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, et al. Characterization and comparison of invasive Corynebacterium diphtheriae isolates from France and Poland. J Clin Microbiol. 2012 Jan; 50 (1): 173–5.
37. Lake JA, Ehrhardt MJ, Suchi M, Chun RH, Willoughby RE. A Case of Necrotizing Epiglottitis Due to Nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae. Pediatrics. 2015 Jul; 136 (1): e242–5.
38. Wojewoda CM, Koval CE, Wilson DA, Chakos MH, Harrington SM. Bloodstream Infection Caused by Nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae in an Immunocompromised Host in the United States. J Clin Microbiol. 2012 Jun; 50 (6): 2170–2.
39. Pimenta FP, Matias GA, Pereira GA, Camello TC, Alves GB, Rosa AC, et al. A PCR for dtxR gene: Application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic Corynebacterium diphtheriae. Mol Cell Probes. 2008 Jun; 22 (3): 189–92.

ИНГИБИТОРЫ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ КЛАССОВ АМИНОПИРИДИНОВ И АМИНОПИРИМИДИНОВ — КАНДИДАТЫ В ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА

Д. А. Маслов[1], О. Б. Беккер[1], М. Г. Алексеева[1], Л. М. Князева[1], Д. А. Мавлетова[1], И. И. Афанасьев[2], Н. И. Василевич[2], В. Н. Даниленко[1]✉

[1] Лаборатория генетики микроорганизмов, Отдел генетических основ биотехнологии, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

[2] ООО «Новые научные технологии», Москва

Туберкулез — самая смертоносная бактериальная инфекция из известных человеку, при этом ее лечение осложнено появлением и быстрым распространением штаммов возбудителя, *Mycobacterium tuberculosis*, с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ). В результате главным требованием к разрабатываемым противотуберкулезным препаратам является использование новых классов химических соединений, поражающих новые биомишени. Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) — перспективные мишени, а аминопиридины и аминопиримидины, ранее не применявшиеся в качестве противотуберкулезных препаратов, имеют предсказанную активность в отношении СТПК. В данной работе в тест-системе *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*, предназначенной для отбора ингибиторов СТПК на клеточном уровне, был проведен скрининг 192 соединений двух указанных классов. Сначала отобрали 53 соединения с субингибирующей концентрацией до 100 нмоль/диск. Из них 22 соединения проявили активность в тест-системе как ингибиторы СТПК, которая была подтверждена *in vitro* на белке PknA *M. tuberculosis* (наивысшее значение показателя ингибирования — 26,9 ± 6,1 %). Также отобранные соединения тестировали на токсичность *in vitro* на клетках фибробластов эмбриона человека с использованием МТТ-теста. В результате для дальнейших исследований в качестве новых препаратов для борьбы с МЛУ-туберкулезом были отобраны 3 ингибитора СТПК с относительно высокой активностью и относительно низкой токсичностью.

Ключевые слова: туберкулез, множественная лекарственная устойчивость, серин-треониновые протеинкиназы, аминопиридины, аминопиримидины, ингибиторы, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *aphVIII*

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.576.21.0019 от 27 июля 2014 г., шифр RFMEFI57614X0019).

✉ **Для корреспонденции:** Даниленко Валерий Николаевич
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; valerid@vigg.ru

Статья получена: 30.01.2017 **Статья принята к печати:** 11.02.2017

AMINOPYRIDINE- AND AMINOPYRIMIDINE-BASED SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE INHIBITORS ARE DRUG CANDIDATES FOR TREATING DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

Maslov DA[1], Bekker OB[1], Alekseeva MG[1], Kniazeva LM[1], Mavletova DA[1], Afanasyev II[2], Vasilevich NI[2], Danilenko VN[1]✉

[1] Laboratory of Bacterial Genetics, Department of Genetics and Biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia

[2] Novie Nauchnie Tekhnologii Ltd., Moscow, Russia

Tuberculosis (TB) is the world's deadliest bacterial infection. Its causative agent *Mycobacterium tuberculosis* evolves into rapidly spreading multidrug-resistant and extensively drug-resistant (MDR and XDR) strains, which complicates the treatment. Therefore, the use of novel target-specific chemical compounds is crucial for the development of effective antituberculosis agents. Serine/threonine protein kinases (STPKs) of *M. tuberculosis* are currently considered as attractive drug targets. In turn, aminopyridines and aminopyrimidines that have not been used for TB treatment so far exhibit inhibitory activity towards STPKs. In this study we screened 192 aminopyridine- and aminopyrimidine-based compounds using the M*ycobacterium smegmatis aphVIII+* test system designed to screen for active STPKs inhibitors. First, we selected 53 compounds with subinhibiting concentrations of up to 100 nmol/disk. Of them, 22 showed STPKs-inhibiting activity in the test system, which was confirmed *in vitro* on the *M. tuberculosis* PknA protein with a maximum of 26.9 ± 6.1 %. Toxicity testing was performed *in vitro* on human embryo fibroblasts using the MTT-assay. Ultimately, 3 relatively active and relatively non-toxic STPKs inhibitors were selected for further research as drug candidates for MDR-TB treatment.

Keywords: tuberculosis, multidrug resistance, serine/threonine protein kinases, aminopyridines, aminopyrimidines, inhibitors, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *aphVIII*

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant No. 14.576.21.0019 dated July 27, 2014; ID RFMEFI57614X0019).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valery Danilenko
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119991; valerid@vigg.ru

Received: 30.01.2017 **Accepted:** 11.02.2017

Туберкулез — одно из самых опасных инфекционных заболеваний современности, уносящее ежегодно более 1,4 млн жизней при 10,4 млн новых случаев заболевания [1]. Главной проблемой в лечении туберкулеза является возникновение и широкое распространение форм с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), выражающейся в резистентности возбудителя, *Mycobacterium tuberculosis*, к самым эффективным и слаботоксичным противотуберкулезным препаратам первого ряда — рифампицину и изониазиду [2], вследствие чего возникает необходимость прибегать к применению более дорогих и токсичных препаратов второго ряда [3]. Частным случаем МЛУ является широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) — МЛУ с дополнительной устойчивостью к одному препарату из группы фторхинолонов и к одному из инъекционных препаратов второго ряда (амикацин, канамицин либо капреомицин) [3]. В последние годы в Иране, Индии и ЮАР фиксировали случаи инфицирования *M. tuberculosis*, устойчивой ко всем применяемым противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда, т. е. обладающей тотальной лекарственной устойчивостью [4–6]. Россия и другие страны постсоветского пространства лидируют по уровню распространения туберкулеза с МЛУ [7]: почти в каждом пятом случае из всех случаев впервые диагностируемого туберкулеза и каждом втором — из всех случаев ранее леченного туберкулеза наблюдается МЛУ [1].

В последние 50–60 лет, т. е. в эру антибиотиков, наблюдается направленный отбор лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. В норме, при частоте случайных мутаций 10^{-6}–10^{-8} на одно клеточное деление, встретить МЛУ-штамм было бы практически невозможно, особенно при комплексной противотуберкулезной терапии. Однако развитию и распространению МЛУ способствует ряд факторов: монотерапия, обусловленная отсутствием запасов необходимых лекарств; неправильные или неэффективные режимы химиотерапии; несоблюдение режима химиотерапии самими пациентами [8]. Свою роль в этом процессе играет и длительное применение одного и того же набора препаратов. Так, за последние 40 лет единственным новым противотуберкулезным препаратом, введеным в клиническую практику, стал бедаквилин [9].

Повышение эффективности лечения туберкулеза зависит от разработки новых лекарственных препаратов, способных воздействовать на новые биомишени, тем самым преодолевая имеющиеся у возбудителя механизмы устойчивости. Перспективными мишенями представляются серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) — одни из наиболее универсальных регуляторов жизнеспособности про- и эукариотических клеток. В частности, у микобактерий эти ферменты регулируют такие важные процессы жизнедеятельности клетки, как рост и деление, вирулентность, персистенция и природная лекарственная устойчивость к антибиотикам [10–14]. Способность ингибировать СТПК с высоким уровнем специфичности была показана для соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов [15], при этом ранее они не применялись в качестве противотуберкулезных препаратов, поэтому к ним нет пула устойчивых мутантов.

Ранее авторами была создана и валидирована тест-система *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*, способная отбирать активные ингибиторы микобактериальных СТПК и, в частности, PknA *M. tuberculosis* [16]. Целью данной работы являлся отбор активных ингибиторов СТПК среди соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов — кандидатов в противотуберкулезные препараты, способные преодолевать МЛУ и ШЛУ.

Результаты, представленные в статье, являются частью диссертации на соискание степени кандидата биологических наук, защищенной одним из авторов в декабре 2016 г. [17]. Полученные результаты не публиковались ранее, и авторы считают их достаточно значимыми для представления широкой научной общественности путем опубликования в научном журнале.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS и штамм *M. smegmatis* mc^2 155. Для культивирования *E. coli* использовали среду LB (Amresco, США), а для *M. smegmatis* — среду Lemco-Tw (5 г/л Lemco Powder, 5 г/л NaCl, 5 г/л бакто-пептона, 0,05 % Tween-80). Культивирование бактерий в жидкой среде проводили в шейкере-инкубаторе Multitron (Infors HT, Швейцария) при 37 °C и 250 об/мин. Твердые среды содержали 2,0 % агара. В качестве среды для тестирования соединений в тест-системе использовали среду M290 (триптон-соевый агар, HiMedia, Индия).

Методика тестирования соединений в тест-системе M. smegmatis aphVIII+

Культуру *M. smegmatis aphVIII+* разводили в соотношении 1 : 9 : 10 (культура : вода : среда M290) и заливали верхним слоем на чашки Петри с агаризованной средой M290 в качестве нижнего слоя. В среду добавляли селективный антибиотик гигромицин до конечной концентрации 50 мкг/мл, а также тетрациклин в концентрации 10 нг/мл для индукции. После высыхания чашек с культурой на них накладывали бумажные диски либо с исследуемым соединением, либо с канамицином, либо с их комбинацией. Чашки инкубировали при 37 °C до появления газона, после чего производили измерение зон ингибирования роста культуры в 3–5 независимых повторах [16].

Очистка белков PknA M. tuberculosis и AphVIII

Синтез гена *pknA M. tuberculosis* с адаптацией кодонов для оптимизации экспрессии в клетках *E. coli* был проведен компанией «Евроген» (Россия). Ген был синтезирован и клонирован в составе экспрессионного вектора pET-32a. Плазмиды, содержащие гены *pknA* и *aphVIII* (pET16b-aphVIII) [18], были трансформированы в штамм *E. coli* BL21 (DE3) pLysS методом кальциевой трансформации [19]. Экспрессию проводили в течение ночи индукцией изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (IPTG; Anatrace, США) в концентрации 1 мМ. Очистку белков проводили при помощи набора Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, США).

Постановка in vitro киназной реакции

Ингибирующая активность соединений в отношении PknA и AphVIII проверялась в киназной реакции при помощи набора Kinase-Glo Plus Luminiscent Kinase Assay Kit (Promega, США) на рабочей станции Biomek 3000 (Beckman Coulter, США) по методике, описанной Baki и соавт. [20]. Фосфорилирование субстрата оценивали косвенно — по уровню люминисценции остаточной АТФ. В качестве субстрата

PknA использовали олигопептид IVDAELTGEIPII, в качестве субстрата AphVIII — канамицин. Реакцию проводили в рабочем растворе: 15 мМ HEPES (pH 7,4), 20 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ EDTA, 0,02 % Tween-20, 0,1 мг/мл BSA.

Количественный состав реакционной смеси (45 мкл) в киназной реакции с PknA: белок — 3 мкг, АТФ — 5 мкМ, субстрат — 50 мкг.

Количественный состав реакционной смеси (45 мкл) в киназной реакции с APHVIII: белок — 50 нг, АТФ — 10 мкМ, субстрат — 5 мкг.

Анализ цитотоксичности соединений

Анализ цитотоксичности проводили при помощи МТТ-теста на фибробластах эмбриона человека (кожно-мышечная ткань; ФЭЧ-4). О жизнеспособности клеток судили по изменению цвета, происходящему при восстановлении тетразоля в формазан дегидрогеназами митохондрий. Окраску регистрировали на ридере Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter США) при длине волны возбуждения 595 нм. Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировались только со средой (контроль), принимали за 100 % [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор активных ингибиторов СТПК в тест-системе M. smegmatis aphVIII+

В ранее валидированной тест-системе *M. smegmatis aphVIII+* дисковым методом был проведен первичный отбор ингибиторов СТПК из числа 192 соединений класса аминопиридинов и аминопиримидинов.

Тест-система функционирует следующим образом: СТПК MSMEG_5513 фосфорилирует белок APHVIII в клетках *M. smegmatis*, повышая устойчивость клеток к канамицину; при добавлении активного ингибитора СТПК, действующего на MSMEG_5513, прекращается фосфорилирование APHVIII, снижается его активность и, как следствие, устойчивость бактериальных клеток к канамицину. Собственная антимикобактериальная активность ингибитора обусловливается ингибированием им же СТПК MSMEG_0030 (ортолог PknA *M. tuberculosis*) — жизненно важного белка для микобактерий, а также, возможно, других биомишеней. В опыте эффект снижения уровня устойчивости к канамицину выражался в увеличении зоны ингибирования роста вокруг диска, содержавшего комбинацию канамицина и активного ингибитора СТПК, относительно диска, содержавшего только канамицин (рис. 1) [16].

Одним из критериев отбора соединений в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+* является величина их субингибирующей концентрации. Для 53 соединений этот показатель составил до 100 нмоль/диск, в то время как остальные соединения в такой концентрации не проявили антибактериального действия в отношении *M. smegmatis*. Отобранные соединения были протестированы с помощью тест-системы, при этом ингибитор СТПК LCTA-1389 (11b) [22, 23] взяли в качестве положительного контроля, а неактивный аналог стандартных ингибиторов СТПК класса индолилмалеимидов BisV [24] — в качестве отрицательного.

Достоверное увеличение зоны ингибирования роста бактериальной культуры на твердой питательной среде при совместном действии с канамицином (при сравнении с зоной, образуемой только лишь под действием канамицина) показали 22 соединения, которые исследовали в дальнейшем в качестве ингибиторов микобактериальных СТПК и потенциальных «хит»-соединений (рис. 2): 1f8, 1g8, 1e11, 1g11, 1h11, 1a12, 1c8, 2f4, 2c3, 2c6, 2a3, 2a4, 2a7, 2h11, 2h12, 2d3, 2d11, 2b4, 2b5, 2e12, 2g12, 2h12.

Исследование in vitro ингибирующей активности отобранных соединений в отношении белка PknA M. tuberculosis

Перечисленные выше соединения тестировали на способность ингибировать СТПК PknA *M. tuberculosis in vitro* в концентрации 200 мкМ (молярное соотношение ингибитор : мишень — 154 : 1). В качестве положительного и отрицательного контролей также использовали LCTA-1389 (11b) и BisV соответственно. Результаты измерения степени ингибирования киназной реакции представлены на рис. 3. Все соединения проявили ингибирующую активность на уровне положительного контроля или выше, как в случае с двумя соединениями: 1H11 (26,9 ± 6,1 %) и 2G12 (23,2 ± 2,0 %).

Все отобранные соединения также были проверены в том же молярном соотношении (ингибитор : мишень) на способность ингибировать фосфотрансферазную активность APHVIII *in vitro* — для исключения их неспецифического действия в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*. Ни одно соединение не проявило такой активности, т. е. их активность в клеточной тест-системе была обусловлена ингибированием именно СТПК *M. smegmatis*, а не белка APHVIII.

Исследование цитотоксичности отобранных соединений

Отобранные соединения были проверены на цитотоксичность на клетках ФЭЧ-4 и по результатам разделены на три группы: сильно токсичные (< 10 мкг/мл; 1F8, 1G11, 2D11, 2F4, 2C3, 2A3, 2H11); среднетоксичные (10–50 мкг/мл; 1E11, 1G8, 1H11, 2D3, 2E12, 2G12, 2A4, 2A7); слаботоксичные (> 50 мкг/мл; 2C6).

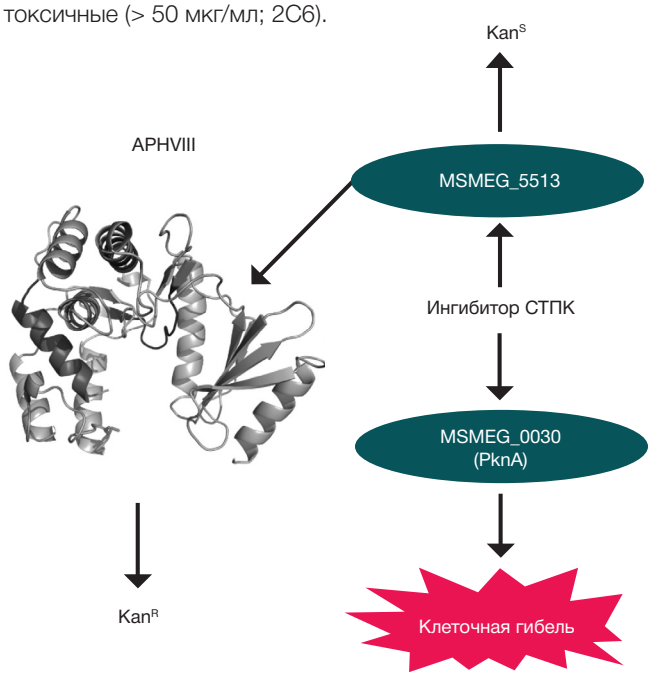


Рис. 1. Схема функционирования тест-системы *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*

Kan^R — повышение устойчивости к канамицину, Kan^S — понижение устойчивости к канамицину, СТПК — серин-треониновая протеинкиназа. Подробнее — в тексте статьи.

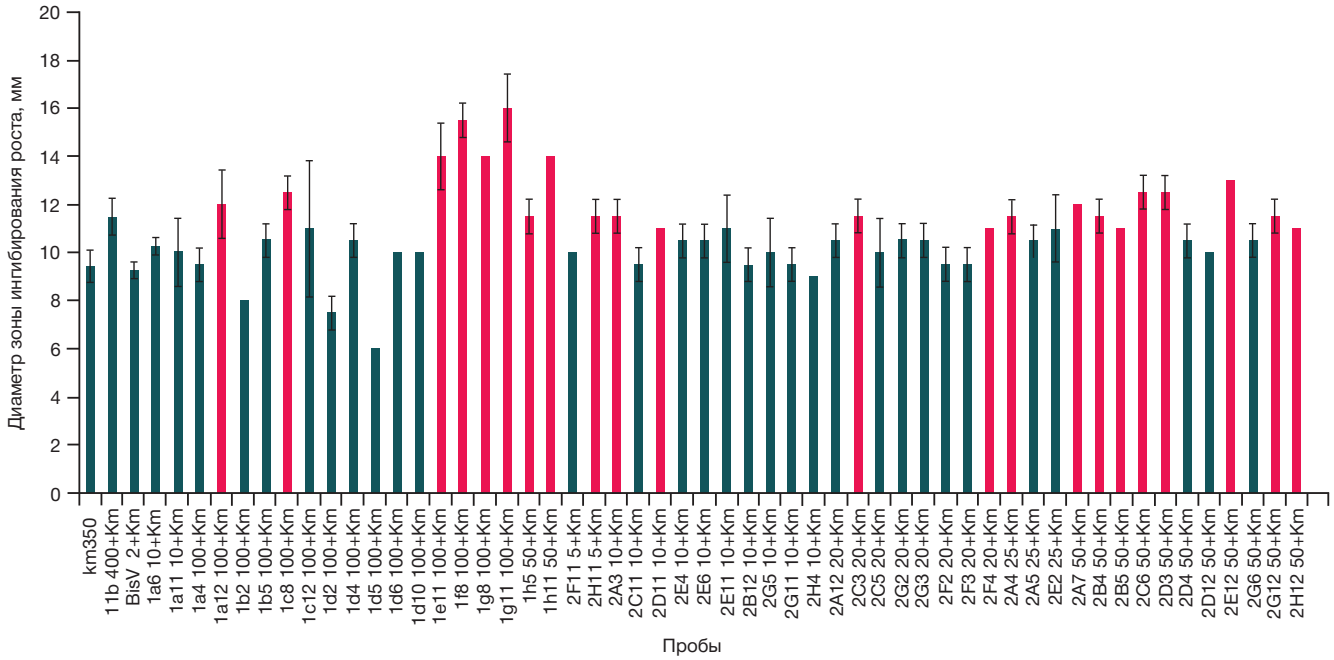


Рис. 2. Результаты измерения зон ингибирования роста бактериальной культуры соединениями классов аминопиридинов и аминопиримидинов в тест-системе *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*

Соединения тестировали в субингибирующих концентрациях (нмоль/диск; указаны в названиях проб), не приводящих к появлению зоны ингибирования роста бактериальной культуры. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Красным цветом выделены отобранные соединения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В эпоху развития и распространения лекарственной устойчивости среди штаммов *M. tuberculosis* разрабатываемые противотуберкулезные препараты должны обладать двумя основными характеристиками: принципиально новым механизмом действия и низкой токсичностью для человека.

Концепция разработки антибактериальных препаратов (в том числе антимикобактериальных), применяемая в течение последних 15 лет, основана на биохимическом мишень-направленном отборе соединений, ингибирующих жизненно важные бактериальные ферменты. Эта концепция имела ограничения применительно к *M. tuberculosis* в связи с тем, что подавляющее большинство отобранных таким способом соединений не оказывало действия на бактериальную клетку в силу разных причин, например из-за непроницаемости бактериальной клеточной стенки для этих химических соединений [25]. Тогда исследователи вернулись к скринингу соединений на быстрорастущей *M. smegmatis*, поскольку ее клеточная стенка по проницаемости схожа с таковой у *M. tuberculosis*, и именно так был отобран бедаквилин [26]. Однако при таком подходе возникает необходимость дальнейшего уточнения биомишени, на которую действует отобранное соединение [27].

Тест-система *M. smegmatis aphVIII+* позволяет проводить отбор как по антимикобактериальному действию, так и по мишень-специфичности [16]. Последняя была подтверждена *in vitro* для отобранных в работе соединений, хотя невозможность определения концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50}, вызванная, вероятно, пониженной активностью белка PknA, очищавшегося нами в виде фьюжн-белка с тиоредоксином, является относительным недостатком исследования. Большое количество белка в реакционной смеси делало необходимым анализ максимально растворимой концентрации тестируемых соединений. Однако сравнение ингибирующей активности отобранных соединений с положительным контролем [22, 23] и, в частности, превосхождение его показателей *in vitro* соединениями 1H11 и 2G12 наряду с ранее показанной ингибирующей активностью соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов в отношении СТПК [15], позволяет говорить о перспективе их использования в качестве эффективных ингибиторов СТПК.

В результате проведенного скрининга нами были отобраны для дальнейшей разработки в качестве потенциальных противотуберкулезных препаратов нового поколения, ингибиторов микобактериальных СТПК, три соединения, проявившие наибольшую активность в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*, на белке PknA *in vitro* и наименьшую токсичность на культуре клеток человека (рис. 4). Два

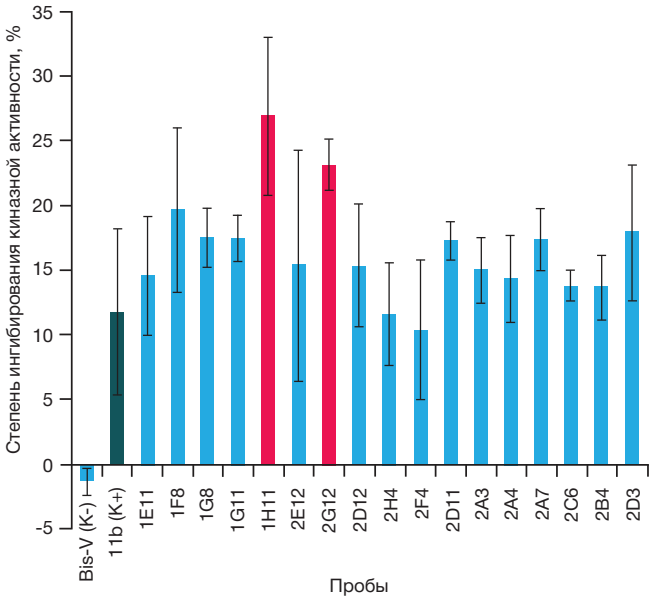


Рис. 3. Ингибирование фосфорилирующей активности PknA *Mycobacterium tuberculosis in vitro* соединениями, отобранными в тест-системе *Mycobacterium smegmatis aphVIII+*

Планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Зеленым цветом выделен положительный контроль, красным — самые активные соединения.

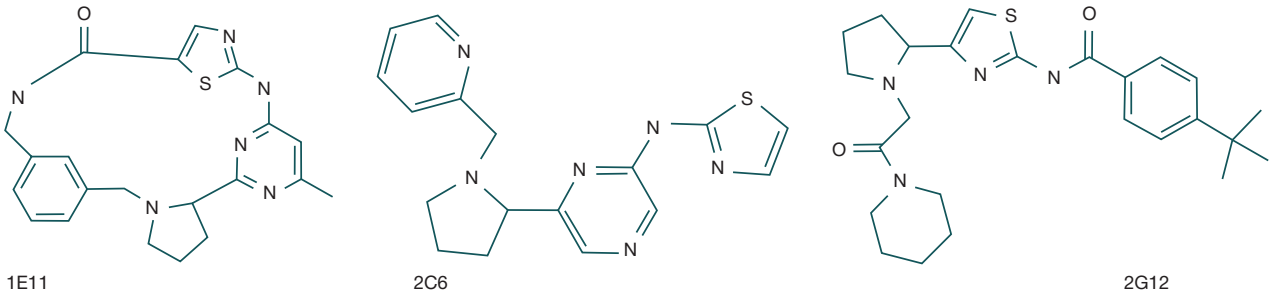


Рис. 4. Химические формулы соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов, отобранных в качестве потенциальных противотуберкулезных препаратов

соединения с наивысшей активностью (1H11 и 2G12) были отнесены к группе среднетоксичных, но в данной работе был проведен первичный скрининг, позволивший отобрать «хит»-соединения, а их дальнейшая лидерная оптимизация может быть направлена как на повышение их активности, так и на снижение токсичности: активность соединений должна быть проверена непосредственно на *M. tuberculosis*, должна быть оценена их острая и хроническая токсичность *in vivo*, а также они должны быть протестированы на панели СТПК человека во избежание их неспецифичного действия.

ВЫВОДЫ

В работе показана принципиальная возможность разработки новых препаратов для борьбы с лекарственно устойчивыми формами туберкулеза на основе аминопиридинов и аминопиримидинов. Отобранные «хит»-соединения (1E11, 2C6, 2G12) требуют дальнейшей проверки на антимикобактериальную активность в отношении *M. tuberculosis* и лидерной оптимизации с фокусом на возможное повышение их активности и снижение токсичности.

Литература

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva, Switzerland; 2016. p. 1–214.
2. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. The Lancet. 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
3. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Lancet Infect Dis Elsevier; 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
4. Parida SK, Axelsson-Robertson R, Rao MV, Singh N, Master I, Lutckii A, et al. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. J Intern Med. 2015 Apr; 277 (4): 388–405.
5. Klopper M, Warren RM, Hayes C, Gey van Pittius NC, Streicher EM, Müller B, et al. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa. Emerging Infect Dis. 2013 Mar; 19 (3): 449–55.
6. Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). Int J Clin Exp Med. 2013; 6 (4): 307–9.
7. Прозоров А. А., Зайчикова М. В., Даниленко В. Н. Мутанты Mycobacterium tuberculosis с множественной лекарственной устойчивостью: история появления, генетические и молекулярные механизмы устойчивости, возникающие проблемы. Генетика. 2012; 48 (1): 5–20.
8. Vareldzis BP, Grosset J, de Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M, et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. Tuber. Lung Dis. 1994 Feb; 75 (1): 1–7.
9. Kakkar AK, Dahiya N. Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: promises and pitfalls. Tuberculosis. 2014 Jul; 94 (4): 357–62.
10. Прозоров А. А., Федорова И. А., Беккер О. Б., Даниленко В. Н. Факторы вирулентности Mycobacterium tuberculosis: генетический контроль, новые концепции. Генетика. 2014; 50 (8): 885–908.
11. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, la Paz Santangelo de M, et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. Virulence. 2013 Jan 1; 4 (1): 3–66.
12. Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatosh SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. Curr Top Med Chem. 2011; 11 (11): 1352–69.
13. Cousin C, Derouiche A, Shi L, Pagot Y, Poncet S, Mijakovic I. Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. FEMS Microbiol Lett. 2013 Sep; 346 (1): 11–9.
14. Canova MJ, Molle V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. J Biol Chem. 2014 Apr 4; 289 (14): 9473–9.
15. Seganish WM, Fischmann TO, Sherborne B, Matasi J, Lavey B, McElroy WT, et al. Discovery and Structure Enabled Synthesis of 2,6-Diaminopyrimidin-4-one IRAK4 Inhibitors. ACS Med Chem Lett. 2015 Aug 13; 6 (8): 942–7.
16. Bekker OB, Sokolov DN, Luzina OA, Komarova NI, Gatilov YV, Andreevskaya SN, et al. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against Mycobacterium tuberculosis. Med Chem Res. 2015; 24: 2926.
17. Маслов Д. А. Создание тест-системы для отбора ингибиторов-серин-треониновых протеинкиназ микобактерий [диссертация]. М.: Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, 2016.
18. Sizova IA, Hegemann P, Furmann M, Danilenko VN. Streptomyces rimosus Aminoglycoside 3“-Phosphotransferase VIII: Comparisons with Aminoglycoside 3-”Phosphotransferases of Aminoglycoside-Producing Strains and with Eukaryotic Protein Kinases. Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2002; 36 (1): 18–25.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
20. Baki A, Bielik A, Molnár L, Szendrei G, Keserü GM. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 βInhibitors. ASSAY and Drug Development Technologies. 2007 Feb; 5 (1): 75–84.
21. Lunagariya MV, Thakor KP, Waghela BN, Vaidya FU, Pathak C, Patel MN. Design, synthesis, MTT assay, DNA interaction studies of platinum(II) complexes. J Biomol Struct Dyn. 2017 Jan 4: 1–18.
22. Симонов А. Ю., Лакатош С. А., Лузиков Ю. Н., Резникова М. И., Сусова О. Ю., Штиль А. А, и др. Синтез 4-замещенных 3-[3-(диалкиламинометил)индол-1-ил]малеинимидов и изучение их способности ингибировать протеинкиназу С-α, предотвращать развитие множественной лекарственной

устойчивости опухолевых клеток и цитотоксичности. Известия Академии наук. Серия химическая. 2008; (9): 1977–85.
23. Bekker OB, Alekseeva MG, Osolodkin DI, Palyulin VA, Elizarov SM, Zefirov NS, et al. New Test System for Serine/Threonine Protein Kinase Inhibitors Screening: E. coli APHVIII/Pk25 design. Acta Naturae. Park Media; 2010 Jul; 2 (3): 110–21.
24. Davis PD, Hill CH, Lawton G, Nixon JS, Wilkinson SE, Hurst SA, et al. Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmaleimides. J Med Chem. 1992 Jan; 35 (1): 177–84.
25. Coxon GD, Cooper CB, Gillespie SH, McHugh TD. Strategies and challenges involved in the discovery of new chemical entities during early-stage tuberculosis drug discovery. J. Infect. Dis. Oxford University Press; 2012 May 15;205 Suppl 2(suppl 2): S258–64.
26. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HWH, Neefs J-M, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. Science. American Association for the Advancement of Science; 2005 Jan 14; 307 (5707): 223–227.
27. Cooper CB. Development of Mycobacterium tuberculosis Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. J Med Chem: 2013 Oct 24; 56 (20): 7755–7760.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva, Switzerland; 2016. p. 1–214.
2. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. The Lancet. 2010 May; 375 (9728): 1830–43.
3. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Lancet Infect Dis. Elsevier; 2010 Sep; 10 (9): 621–9.
4. Parida SK, Axelsson-Robertson R, Rao MV, Singh N, Master I, Lutckii A, et al. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. J Intern Med. 2015 Apr; 277 (4): 388–405.
5. Klopper M, Warren RM, Hayes C, Gey van Pittius NC, Streicher EM, Müller B, et al. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa. Emerging Infect. Dis. 2013 Mar; 19 (3): 449–55.
6. Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). Int J Clin Exp Med. 2013; 6 (4): 307–9.
7. Prozorov AA, Zaichikova MV, Danilenko VN. [Mycobacterium tuberculosis mutants with multidrug resistance: History of origin, genetic and molecular mechanisms of resistance, and emerging challenges]. Russ J Genet. 2012 Jan 1; 48 (1): 1–14. Russian
8. Vareldzis BP, Grosset J, de Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M, et al. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. Tuber Lung Dis. 1994 Feb; 75 (1): 1–7.
9. Kakkar AK, Dahiya N. Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: promises and pitfalls. Tuberculosis. 2014 Jul; 94 (4): 357–62.
10. Prozorov AA, Fedorova IA, Bekker OB, Danilenko VN. [The virulence factors of Mycobacterium tuberculosis: Genetic control, new conceptions]. Russ J Genet. 2014 Aug 1; 50 (8): 775–97.
11. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, la Paz Santangelo de M, et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. Virulence. 2013 Jan 1; 4 (1): 3–66.
12. Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatosh SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. Curr Top Med Chem. 2011; 11 (11): 1352–69.
13. Cousin C, Derouiche A, Shi L, Pagot Y, Poncet S, Mijakovic I. Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. FEMS Microbiol. Lett. 2013 Sep; 346 (1): 11–9.
14. Canova MJ, Molle V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. J. Biol. Chem. 2014 Apr 4; 289 (14): 9473–9.
15. Seganish WM, Fischmann TO, Sherborne B, Matasi J, Lavey B, McElroy WT, et al. Discovery and Structure Enabled Synthesis of 2,6-Diaminopyrimidin-4-one IRAK4 Inhibitors. ACS Med. Chem. Lett. 2015 Aug 13; 6 (8): 942–7.
16. Bekker OB, Sokolov DN, Luzina OA, Komarova NI, Gatilov YV, Andreevskaya SN, et al. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against Mycobacterium tuberculosis. Med Chem Res. 2015; 24: 2926.
17. Maslov DA. Sozdanie test-sistemy dlya otbora ingibitorov serin-treoninovykh proteinkinaz mikobakteriy [dissertation]. Moscow: Vavilov Institute of General Genetics of RAS, 2016. Russian.
18. Sizova IA, Hegemann P, Furmann M, Danilenko VN. Streptomyces rimosus Aminoglycoside 3“-Phosphotransferase VIII: Comparisons with Aminoglycoside 3-”Phosphotransferases of Aminoglycoside-Producing Strains and with Eukaryotic Protein Kinases. Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2002; 36 (1): 18–25.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
20. Baki A, Bielik A, Molnár L, Szendrei G, Keserü GM. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 βInhibitors. ASSAY and Drug Development Technologies. 2007 Feb; 5 (1): 75–84.
21. Lunagariya MV, Thakor KP, Waghela BN, Vaidya FU, Pathak C, Patel MN. Design, synthesis, MTT assay, DNA interaction studies of platinum(II) complexes. J. Biomol. Struct. Dyn. 2017 Jan 4: 1–18.
22. Simonov AYu, Lakatosh SA, Luzikov YuN, Reznikova MI, Susova OYu, Shtil' AA, i dr. Sintez 4-zameshchennykh 3-[3-(dialkilaminometil)indol-1-il]maleinimidov i izuchenie ikh sposobnosti ingibirovat' proteinkinazu C-α, predotvrashchat' razvitie mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivosti opukholevykh kletok i tsitotoksichnosti. Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya. 2008; (9): 1977–85. Russian
23. Bekker OB, Alekseeva MG, Osolodkin DI, Palyulin VA, Elizarov SM, Zefirov NS, et al. New Test System for Serine/Threonine Protein Kinase Inhibitors Screening: E. coli APHVIII/Pk25 design. Acta Naturae. Park Media; 2010 Jul; 2 (3): 110–21.
24. Davis PD, Hill CH, Lawton G, Nixon JS, Wilkinson SE, Hurst SA, et al. Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmaleimides. J Med Chem. 1992 Jan; 35 (1): 177–84.
25. Coxon GD, Cooper CB, Gillespie SH, McHugh TD. Strategies and challenges involved in the discovery of new chemical entities during early-stage tuberculosis drug discovery. J. Infect. Dis. Oxford University Press; 2012 May 15;205 Suppl 2(suppl 2): S258–64.
26. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HWH, Neefs J-M, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. Science; 2005 Jan; 307 (5707): 223–227.
27. Cooper CB. Development of Mycobacterium tuberculosis Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents. J Med Chem: 2013 Oct 24; 56 (20): 7755–7760.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ, МЕТОДОМ MIRU-VNTR

К. В. Шур, Д. А. Маслов, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко ✉

Лаборатория генетики микроорганизмов, Отдел генетических основ биотехнологии,
Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Под воздействием различных селективных факторов (применение антибиотиков, генетический полиморфизм и разнообразие иммунных статусов хозяина и др.) возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* постоянно эволюционирует. Возникают новые линии и сублинии, характеризующиеся набором значимых и незначимых мутаций. Анализ и мониторинг представленности различных линий и их особенностей является важным для понимания эволюции патогена. В данной работе была использована коллекция из 46 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных в Московском регионе. Была определена их генотипическая принадлежность к различным линиям и сублиниям типированием по 24 локусам MIRU-VNTR. Было показано преобладание изолятов линии Beijing в коллекции (60,9 %) и изолятов сублинии Beijing-B0/W148 (60,7 % внутри линии Beijing), характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью (88,2 % изолятов в данной выборке). Также использованный метод позволил определить один предполагаемый случай смешанной инфекции.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотипирование, филогенетика, эпидемиология, Beijing, MIRU-VNTR

Финансирование: работа выполнена в рамках двустороннего проекта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 13-04-91444 «Токсины–антитоксины и RpsA в лекарственной устойчивости и персистенции микобактерий туберкулеза»).

Благодарности: авторы благодарят коллектив отдела микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза (Москва) и, в частности, д. б. н. Ларису Черноусову за помощь в создании коллекции клинических изолятов *M. tuberculosis*.

✉ **Для корреспонденции:** Даниленко Валерий Николаевич
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119333; valerid@vigg.ru

Статья получена: 01.02.2017 **Статья принята к печати:** 24.02.2017

MIRU-VNTR GENOTYPING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CLINICAL ISOLATES FROM MOSCOW REGION

Shur KV, Maslov DA, Bekker OB, Danilenko VN ✉

Laboratory of Bacterial Genetics, Department of Genetics and Biotechnology,
Vavilov Institute of General Genetics of RAS, Moscow, Russia

Antibiotic selection pressure, genetic polymorphism as well as diversity of the immune status of the host and other selection factors continuously prompt *Mycobacterium tuberculosis*, the tuberculosis causative agent, to evolve. Significant or insignificant mutations shape new (sub)lineages of the pathogen whose evolution can be understood only through analyzing and monitoring its genotypic diversity and properties of its lineages. In our study we used a set of 46 *M. tuberculosis* clinical isolates from Moscow region. The samples were typed using the standard 24-loci MIRU-VNTR technique. Beijing family isolates were shown to prevail in the collection (60.9 %), as well as Beijing-B0/W148 subtype (60.7 % of total Beijing type samples); most of them (88,2 %) were multidrug-resistant resistant. The applied technique allowed us to detect one case of a mixed-strain infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, phylogenetics, epidemiology, Beijing, MIRU-VNTR

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 13-04-91444 *Toxin-antitoxins and RpsA in TB drug resistance and persistence)*.

Acknowledgements: the authors thank the research team of the Department of Microbiology of the Central TB Research Institute (Moscow) for their assistance in preparing a collection of *M. tuberculosis* isolates, with special thanks going to Larisa Chernousova, D. Sci. (Biol).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valery Danilenko
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119333; valerid@vigg.ru

Received: 01.02.2017 **Accepted:** 24.02.2017

Приобретение лекарственной устойчивости штаммами возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* — одна из самых значимых проблем фтизиатрии, в том числе в России, где ежегодно фиксируется 115 тыс. случаев заболевания туберкулезом (80 случаев на 100 тыс. человек), а 20 % всех впервые выявленных и 50 % ранее получавших противотуберкулезную терапию пациентов инфицированы штаммами с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1]. Таким образом, для совершенствования схем терапии, критически важным является поиск и определение особенностей наиболее распространенных на территории России штаммов *M. tuberculosis*.

Изоляты микобактерий туберкулеза относят к различным линиям, каждая из которых имеет определенное географическое происхождение [2] и характеризуется набором филогенетических маркеров, влияющих также на фенотип штамма [3]. В России наиболее часто встречаются представители линии Beijing, которая характеризуется

повышенной трансмиссивностью, вирулентностью, частотой мутаций в геноме и другими свойствами, способствующими их распространению [4].

В недавних исследованиях, проведенных в России [5], были обнаружены штаммы сублинии Beijing-B0/W148. Они характеризуются повышенной (по отношению к родительской линии Beijing) вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью (практически полным отсутствием лекарственно-чувствительных штаммов в данной сублинии). Mokrousov и соавт. назвали Beijing-B0/W148 «успешным клоном» *M. tuberculosis* [5].

Для определения принадлежности штамма/изолята *M. tuberculosis* к какой-либо линии применяют различные методы генотипирования: метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов мобильного элемента IS6110 (IS6110 restriction fragment lengh polymorphism, RFLP), сполиготипирование [6], методы, основанные на маркерных однонуклеотидных полиморфизмах (single nucleotide polymorphism, SNP) генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) [7] и систем токсин–антитоксин II типа [8]. Все эти методы различаются по стоимости и трудоемкости исследования, а также по своей дискриминирующей способности. Одним из наиболее быстрых, дешевых, но в то же время обладающих наибольшей дискриминирующей способностью является молекулярный метод генотипирования, основанный на анализе количества распределенных по геному *M. tuberculosis* повторов — MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units – variable number of tandem repeats) [9].

Ранее нами была проанализирована коллекция ДНК из 64 изолятов *M. tuberculosis* выделенных от пациентов Центрального НИИ туберкулеза (Москва). Изоляты были типированы методом сполиготипирования, показавшим, что 70,3 % из них относятся к линии Beijing [10]. Для определения доли «успешных клонов» Beijing-B0/W148 среди штаммов линии Beijing, а также для более детального анализа филогенетической структуры коллекции нами проведено типирование доступных для анализа 46 образцов ДНК коллекции по 24 локусам MIRU-VNTR. Результаты представлены в этой работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллекция ДНК клинических изолятов M. tuberculosis

В работе использовали коллекцию ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis*, ранее детально описанную Maslov и соавт. [10]. В частности, были установлены сполиготипы изолятов и их профиль лекартсвенной устойчивости к 8 противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда. На основании этого изоляты были разделены на две группы: 1) изоляты, устойчивые хотя бы к одному противотуберкулезному препарату (41 изолят); 2) контрольная группа лекарственно-чувствительных изолятов (23 изолята). В данной работе для анализа были доступны 46 изолятов, из которых к каждой группе относилась половина.

Генотипирование клинических изолятов M. tuberculosis

Генотипирование клинических изолятов проводили по 24 локусам MIRU-VNTR согласно стандартному протоколу [11]. Синтез праймеров для амплификации, описанных в [9], выполнила компания «Синтол» (Россия). Амплификацию проводили в 96-луночных планшетах с объемом лунок 0,2 мл (Bio-Rad, США) с набором для проведения ПЦР «Амплификация» (Dialat, Россия) по протоколу, описанному в [9], на амплификаторе T100 (Bio-Rad, США). Полученные фрагменты разделяли в 2 % агарозном гель-электрофорезе в 1х трис-ацетат-EDTA (TAE) буфере (трис-ацетат — 40 мМ, EDTA — 1 мМ, pH 7,6). Полученные результаты интерпретировали с помощью веб-приложения MIRU-VNTR*plus* [9, 12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Итоговое распределение изолятов *M. tuberculosis* по профилю MIRU-VNTR с использованием программы MIRU-VNTR*plus* было следующим: 60,9 % изолятов относятся к линии Beijing, 13,0 % — к LAM, 13,0 % — к T1 и T2, 4,3 % — к URAL, по одному изоляту (2,2 %) — к линиям Cameroon, S и NEW-1. Для одного изолята не удалось определить принадлежность к определенной линии. В изоляте 13-2078 были обнаружены два аллеля локуса QUB26 — 1 и 7, что может быть свидетельством смешаной инфекции [13].

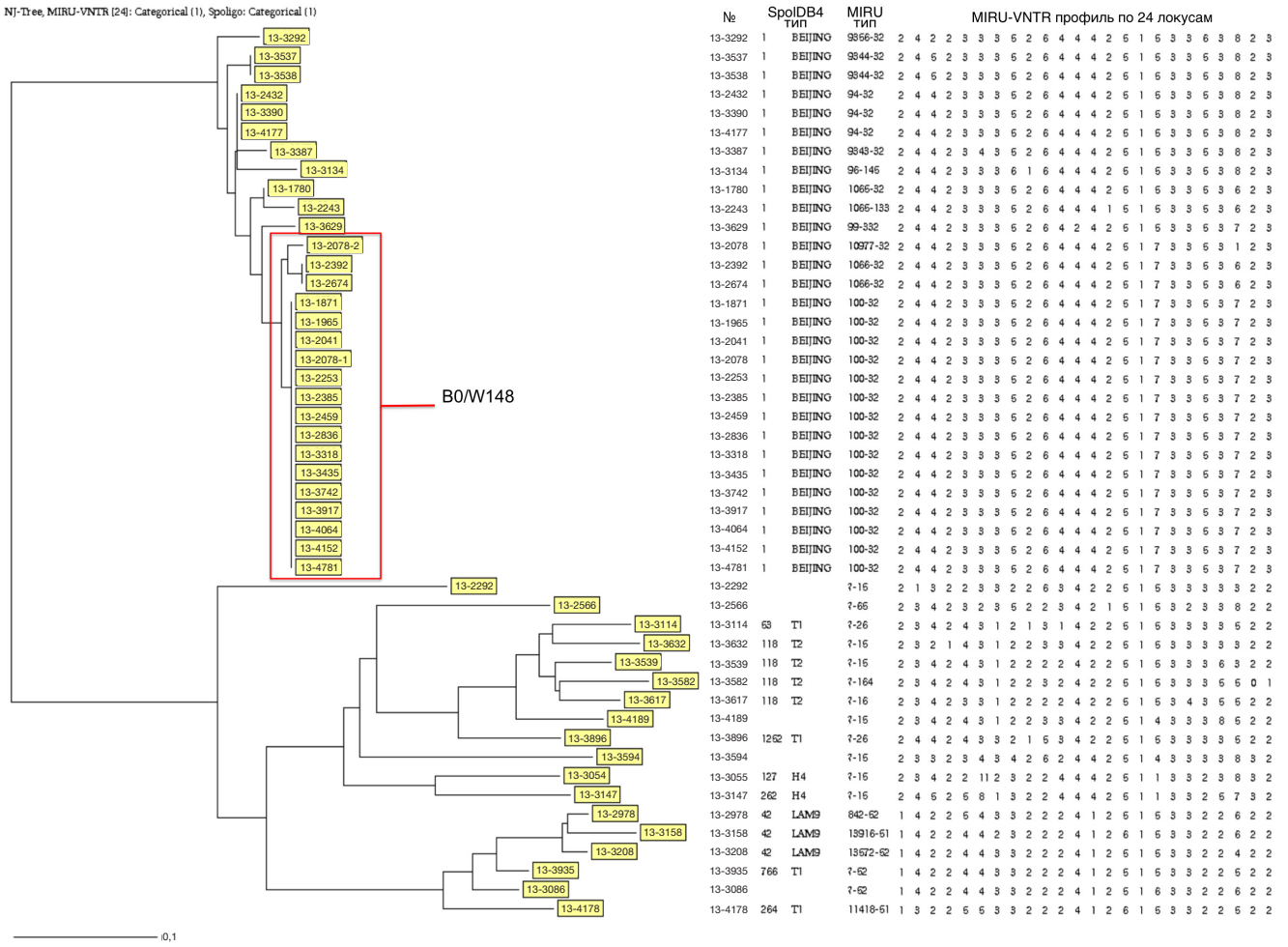
На основе полученных MIRU-VNTR профилей мы построили дендрограмму (рисунок). На ней четко кластеризуются 17 изолятов, относящихся к сублинии B0/W148 (изолят 13-2078 представляет собой смесь двух штаммов, но оба относятся к сублинии B0/W148), составляя, таким образом, 60,7 % всех изолятов линии Beijing. Стоит отметить, что все они относятся к группе А — лекарственно-устойчивым изолятам, при этом 15 из них (88,2 %) обладают МЛУ, из которых, в свою очередь, 3 (20,0 %) обладают широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущей работе [10] мы провели генотипирование изолятов *M. tuberculosis* с использованием сполиготипирования. В результате изоляты разделились на 6 групп: 60,9 % изолятов принадлежат к линии Beijing, 21,7 % — к T1 и T2, 6,5 % — к LAM9, 6,5 % — к H4 (доли указаны для 46 изолятов, исследованных в данной работе). Пять изолятов имели уникальный генотип [10]. Это могло произойти в связи со случайной делецией или инсерцией спейсеров, что является довольно частым явлением из-за высокой вариабельности данного региона.

Проведенный анализ 24 локусов MIRU-VNTR позволил уточнить ранее полученные данные. Так, удалось отнести к различным линиям 4 изолята, ранее отнесеннные к T-кластеру (два — к LAM, по одному — к S и Cameroon), и 3 изолята линии H4 (два — к Ural, один — к NEW1). В то же время удалось выявить представителей сублинии Beijing B0/W148 среди изолятов линии Beijing. Таким образом, MIRU-VNTR являтся более предпочтительным методом генотипирования *M. tuberculosis* в сравнении со сполиготипированием за счет более высокой разрешающей способности и возможности установления случаев смешанной инфекции, хотя наилучшие результаты могут быть получены только при комбинировании различных методик генотипирования.

Все изоляты сублинии Beijing-B0/W148 оказались лекарственно-устойчивыми, преимущественно МЛУ (88,2 %), что характерно для этой группы и согласуется с данными, полученными ранее [5, 14]. Этот факт дополнительно подтверждает «успешность» данной сублинии. Открытым остается вопрос о факторах, способствующих отбору



№	SpolDB4 тип		MIRU тип	MIRU-VNTR профиль по 24 локусам
13-3292	1	BEIJING	3856-32	2 4 2 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3537	1	BEIJING	3844-32	2 4 5 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3538	1	BEIJING	3844-32	2 4 5 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-2432	1	BEIJING	94-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3390	1	BEIJING	94-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-4177	1	BEIJING	94-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3387	1	BEIJING	9843-32	2 4 4 2 3 4 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-3134	1	BEIJING	96-146	2 4 4 2 3 3 3 6 1 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 8 2 3
13-1780	1	BEIJING	1066-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 5 3 3 5 3 6 2 3
13-2243	1	BEIJING	1066-133	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 1 5 1 5 3 3 5 3 6 2 3
13-3629	1	BEIJING	99-332	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 2 4 2 5 1 5 3 3 5 3 7 2 3
13-2078	1	BEIJING	10977-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 1 2 3
13-2392	1	BEIJING	1066-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 6 2 3
13-2674	1	BEIJING	1066-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 6 2 3
13-1871	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-1965	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2041	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2078	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2253	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2385	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2459	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2836	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3318	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3435	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3742	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-3917	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-4064	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-4152	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-4781	1	BEIJING	100-32	2 4 4 2 3 3 3 5 2 6 4 4 4 2 5 1 7 3 3 5 3 7 2 3
13-2292			?-16	2 1 3 2 2 3 3 2 2 6 3 4 2 2 5 1 5 3 3 3 3 3 2 2
13-2566			?-66	2 3 4 2 3 2 3 5 2 2 3 4 2 1 5 1 5 3 2 3 3 8 2 2
13-3114	68	T1	?-26	2 3 4 2 4 3 1 2 1 3 1 4 2 2 5 1 5 3 3 3 3 5 2 2
13-3632	118	T2	?-16	2 3 2 1 4 3 1 2 2 3 3 4 2 2 5 1 5 3 3 3 3 3 2 2
13-3539	118	T2	?-16	2 3 4 2 4 3 1 2 2 2 2 4 2 2 5 1 6 3 3 3 6 3 2 2
13-3582	118	T2	?-164	2 3 4 2 4 3 1 2 2 3 2 4 2 2 5 1 5 3 3 3 5 5 0 1
13-3617	118	T2	?-16	2 3 4 2 3 3 1 2 2 2 2 4 2 2 5 1 5 3 4 3 5 5 2 2
13-4189			?-16	2 3 4 2 4 3 1 2 2 3 3 4 2 2 5 1 4 3 3 3 8 5 2 2
13-3896	1262	T1	?-26	2 4 4 2 4 3 3 2 1 5 3 4 2 2 5 1 5 3 3 3 3 5 2 2
13-3594			?-16	2 3 3 2 3 4 3 4 2 6 2 4 4 2 5 1 4 3 3 3 3 8 3 2
13-3055	127	H4	?-16	2 3 4 2 2 11 2 3 2 2 4 4 4 2 5 1 1 3 3 2 3 8 3 2
13-3147	262	H4	?-16	2 4 5 2 5 8 1 3 2 2 4 4 4 2 5 1 1 3 3 2 5 7 3 2
13-2978	42	LAM9	842-52	1 4 2 2 5 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 6 2 2
13-3158	42	LAM9	13916-51	1 4 2 2 4 4 2 3 2 2 2 4 1 2 6 1 5 3 3 2 2 6 2 2
13-3208	42	LAM9	13672-52	1 4 2 2 4 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 6 3 3 2 2 4 2 2
13-3935	766	T1	?-52	1 4 2 2 4 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 5 3 3 2 2 5 2 2
13-3086			?-52	1 4 2 2 4 4 3 3 2 2 2 4 1 2 5 1 6 3 3 2 2 6 2 2
13-4178	264	T1	11418-51	1 3 2 2 5 5 3 3 2 2 2 4 1 2 6 1 5 3 3 2 2 5 2 2

Филогенетическое NJ-древо изолятов *M. tuberculosis*, выделенных в Московском регионе. Древо построено с использованием данных профиля MIRU-VNTR24 для каждой филогенетической группы. Красным выделена сублиния Beijing-B0/W148

именно этой филогенетической группы. Видимо, повышенная мутационная изменчивость привела к функциональным перестройкам, позволившим повысить вирулентность и выживаемость данной группы [4]. Ответы на эти вопросы предстоит получить в будущих исследованиях.

ВЫВОДЫ

Оценка и эпидемиологический контроль за распространением успешных линий *M. tuberculosis* являются важнейшими задачами в рамках организации эффективной диагностики и лечения больных туберкулезом. Результаты, полученные в исследовании, позволяют говорить о тенденции распространения штаммов сублинии Beijing-B0/W148, для которых характерен МЛУ-фенотип, дополняют существующие эпидемиологические данные для центрального региона России, а также подчеркивают важность применения различных методик генотипирования для наиболее полной характеристики клинических изолятов *M. tuberculosis*.

Литература

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2015. Vol. 1. Geneva, Switzerland; 2015.
2. Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH. Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. PLoS Pathog. 2010 Jul; 6 (7): e1000988. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000988.
3. Mitchison DA, Wallace JG, Bhatia AL, Selkon JB, Subbaiah TV, Lancaster MC. A comparison of the virulence in guinea-pigs of South Indian and British tubercle bacilli. Tubercle. 1960 Feb; 41: 1–22.
4. Villellas C, Aristimuño L, Vitoria M-A, Prat C, Blanco S, García de Viedma D, et al. Analysis of mutations in streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. J Clin Microbiol. 2013 Jul; 51 (7): 2124–30. DOI: 10.1128/JCM.01944-12.
5. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Otten T, Jiao WW, Gomes LL, et al. Russian "successful" clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: A multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. J Clin Microbiol. 2012; 50 (11): 3757–9. DOI: 10.1128/JCM.02001-12.
6. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. J Clin Microbiol. 1995 Dec; 33 (12): 3234–8.
7. Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nubel U, et al. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms. PLoS One. 2012; 7 (7): e39855. DOI:

10.1371/journal.pone.0039855.
8. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. PLoS One. 2015 Dec 14; 10 (12): e0143682. DOI: 10.1371/journal.pone.0143682.
9. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. Nucleic Acids Res. 2010 Jul; 38 (Web Server issue): W326–31. DOI: 10.1093/nar/gkq351. Epub 2010 May 10.
10. Maslov DA, Zaichikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, et al. Resistance to pyrazinamide in Russian Mycobacterium tuberculosis isolates: PncA sequencing versus Bactec MGIT 960. Tuberculosis (Edinb). 2015 Sep; 95 (5): 608–12. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05013.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006 Dec; 44 (12): 4498–510. DOI: 10.1128/JCM.01392-06. Epub 2006 Sep 27.
12. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol. 2008 Aug; 46 (8): 2692–9. DOI: 10.1128/JCM.00540-08. Epub 2008 Jun 11.
13. Cohen T, van Helden PD, Wilson D, Colijn C, McLaughlin MM, Abubakar I, et al. Mixed-strain Mycobacterium tuberculosis infections and the implications for tuberculosis treatment and control. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct; 25 (4):708–19. DOI: 10.1128/CMR.00021-12.
14. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. Tuberculosis (Edinb). 2015 Jun; 95 Supple 1: S167–76. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.031. Epub 2015 Feb 24.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2015. Vol. 1. Geneva, Switzerland; 2015.
2. Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH. Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. PLoS Pathog. 2010 Jul; 6 (7): e1000988. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000988.
3. Mitchison DA, Wallace JG, Bhatia AL, Selkon JB, Subbaiah TV, Lancaster MC. A comparison of the virulence in guinea-pigs of South Indian and British tubercle bacilli. Tubercle. 1960 Feb; 41: 1–22.
4. Villellas C, Aristimuño L, Vitoria M-A, Prat C, Blanco S, García de Viedma D, et al. Analysis of mutations in streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. J Clin Microbiol. 2013 Jul; 51 (7): 2124–30. DOI: 10.1128/JCM.01944-12.
5. Mokrousov I, Narvskaya O, Vyazovaya A, Otten T, Jiao WW, Gomes LL, et al. Russian "successful" clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: A multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. J Clin Microbiol. 2012; 50 (11): 3757–9. DOI: 10.1128/JCM.02001-12.
6. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. J Clin Microbiol. 1995 Dec; 33 (12): 3234–8.
7. Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nubel U, et al. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms. PLoS One. 2012; 7 (7): e39855. DOI: 10.1371/journal.pone.0039855.
8. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. PLoS One. 2015 Dec 14; 10 (12): e0143682. DOI: 10.1371/journal.pone.0143682.
9. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. Nucleic Acids Res. 2010 Jul; 38 (Web Server issue): W326–31. DOI: 10.1093/nar/gkq351. Epub 2010 May 10.
10. Maslov DA, Zaichikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, et al. Resistance to pyrazinamide in Russian Mycobacterium tuberculosis isolates: PncA sequencing versus Bactec MGIT 960. Tuberculosis (Edinb). 2015 Sep; 95 (5): 608–12. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05013.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006 Dec; 44 (12): 4498–510. DOI: 10.1128/JCM.01392-06. Epub 2006 Sep 27.
12. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol. 2008 Aug; 46 (8): 2692–9. DOI: 10.1128/JCM.00540-08. Epub 2008 Jun 11.
13. Cohen T, van Helden PD, Wilson D, Colijn C, McLaughlin MM, Abubakar I, et al. Mixed-strain Mycobacterium tuberculosis infections and the implications for tuberculosis treatment and control. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct; 25 (4):708–19. DOI: 10.1128/CMR.00021-12.
14. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. Tuberculosis (Edinb). 2015 Jun; 95 Supple 1: S167–76. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.031. Epub 2015 Feb 24.

ВЕДЕНИЕ БЕРЕМЕННОЙ ПАЦИЕНТКИ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ И МНОЖЕСТВЕННЫМИ ВТОРИЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НА ФОНЕ ВЫРАЖЕННОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

О. А. Чернявская ✉

Кафедра инфекционных болезней с эпидемиологией и тропической медициной, лечебный факультет, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Возрастающее количество женщин, больных ВИЧ-инфекцией, и рост числа беременностей и родов среди них обусловливают актуальность изучения нетипичных случаев ведения таких пациенток. В настоящей статье проанализированы причины, приведшие к возникновению ситуации, когда беременная женщина с ВИЧ-инфекцией и выраженным иммунодефицитом обратилась за медицинской помощью только при возникновении тяжелых, опасных для жизни вторичных заболеваний. Рассмотрены особенности течения сочетанной с беременностью патологии, приведшей к гибели ребенка и матери. Дана оценка тактики ведения больной, разработаны рекомендации по ведению пациенток с подобными патологиями, а именно: обязательное психологическое сопровождение, настороженность в отношении возможного атипичного течения многих заболеваний, в частности, туберкулеза, максимальное расширение диагностического поиска.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, беременность, выраженный иммунодефицит, вторичные заболевания, туберкулез

Благодарности: Тамаре Кувшиновой из Волгоградской областной клинической инфекционной больницы № 1 и Игорю Малюженко из Волгоградского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями за предоставленные данные.

✉ **Для корреспонденции:** Чернявская Ольга Александровна
ул. Загорская, д. 1, кв. 43, г. Волгоград, 400065; chernyavolga@yandex.ru

Статья получена: 04.02.2017 **Статья принята к печати:** 11.02.2017

MANAGEMENT OF THE HIV-POSITIVE PREGNANT PATIENT WITH MARKED IMMUNODEFICIENCY AND MULTIPLE COMORBIDITIES

Chernyavskaya OA ✉

Department of Infectious Diseases with Epidamiology and Tropical Medicine, Medical Faculty, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Increasing HIV prevalence among women and growing numbers of HIV-positive patients who choose to become pregnant prompt a discussion of management strategies applied to such patients. In this work we analyze a case of a pregnant HIV-positive woman with marked immunodeficiency who started seeking medical advice only after she had developed severe life-threatening secondary conditions. We look at the progression of comorbidities that led to the death of the patient and her baby and evaluate the chosen treatment plan. We also propose recommendations for the management of patients with similar pathologies that include psychological care, vigilance against possible atypical progression of a comorbidity, such as tuberculosis, and extensive diagnostic evaluation.

Keywords: HIV-infection, pregnancy, expressed immunodeficiency, secondary diseases, tuberculosis

Acknowledgements: the author thanks Tamara Kuvshinova of Volgograd Regional Clinical Hospital for Infectious Diseases No.1 and Igor Maluzhenko of Volgograd Regional Center for AIDS and Infectious Diseases Prevention and Treatment for providing valuable data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga Chernyavskaya
ul. Zagorskaya, d. 1, kv. 43, Volgograd, Russia, 400065; chenyavolga@yandex.ru

Received: 04.02.2017 **Accepted:** 11.02.2017

В последние годы в России отмечается увеличение числа случаев передачи ВИЧ-инфекции при половом контакте гетеросексуальных партнеров, поэтому возрастает и доля женщин среди людей, живущих с ВИЧ. В связи с этим повышается актуальность проблемы сочетания беременности и ВИЧ-инфекции: растет доля беременных женщин из числа социально благополучных, все больше инфицированных беременных женщин решают положительно вопрос о рождении ребенка [1–3].

Ведение таких пациенток представляет определенные трудности. Перед врачами стоят задачи по снижению риска трансплацентарной передачи вируса плоду и поддержанию здоровья будущей матери. При этом необходимо, чтобы женщина смогла не только родить здорового ребенка, но и вырастить его. Поэтому женщинам с ВИЧ-инфекцией обязательно назначают высокоактивную антиретровирусную терапию, причем она должна быть своевременной, эффективной и безопасной [1, 4–6].

Беременность — сложный период в жизни любой женщины с точки зрения как физиологии, так и психологии. В этот период она эмоционально уязвима и беспомощна, нуждается в особой заботе и поддержке со стороны окружающих. Наличие ВИЧ-инфекции обусловливает ряд особенностей психического состояния и мотивов сохранения беременности [7]. В частности, показано, что ВИЧ-инфицированные беременные женщины относятся к себе

негативно, снижается социально-ролевая идентичность, устанавливаются противоречивые связи и зависимости между идентичностями, составляющими Я-концепцию [8]. Кроме того, течение беременности у ВИЧ-инфицированных женщин сопровождается более частым развитием осложнений, таких как гестоз, хроническая внутриутробная гипоксия плода, анемия беременных, угроза прерывания беременности, синдром задержки развития плода. Например, в исследовании Яценко [9] указанные состояния, несмотря на проводимую антиретровирусную терапию (АРВТ), отмечались в 23,5, 55,0, 23,7, 20,0 и 7,0 % случаев соответственно. Роды у женщин с положительным ВИЧ-статусом достоверно чаще осложняются их преждевременным наступлением и развитием аномалий родовой деятельности. Оперативное абдоминальное родоразрешение, снижая вероятность интранатального инфицирования плода, достоверно повышает риск послеродовых гнойно-септических осложнений и прогрессирования ВИЧ-инфекции у матери [10]. Особые проблемы возникают на фоне вторичных заболеваний. Если у женщины выраженный иммунодефицит, то такие заболевания угрожают жизни не только будущего ребенка, но и ее самой. Лечение вторичных инфекций затрудняется необходимостью выбора препаратов, оказывающих наименьшее негативное влияние на плод [11–14].

В целом тактика ведения беременных, инфицированных ВИЧ, достаточно хорошо разработана [1, 5, 6, 15, 16]. Ее использование в большинстве случаев приводит к рождению здорового малыша без вреда здоровью матери [1, 17]. Но бывают сложные случаи, которые не всегда заканчиваются благополучно. Ниже приведено клиническое наблюдение одного из них.

Описание клинического случая

Больная У., 31 год, поступила в инфекционный стационар 28 мая 2016 г. с жалобами на повышение температуры тела до 39 °С, слабость, общее недомогание, кашель с небольшим количеством мокроты, одышку, снижение аппетита, похудание (6 кг за месяц), потливость.

Из анамнеза заболевания известно, что заболела остро в конце апреля, когда появился озноб, температура тела повысилась до 39 °С, появился сухой кашель. Лечилась самостоятельно симптоматическими средствами (без эффекта). 20–24 мая 2016 г. прошла стационарное лечение: в соответствии с диагнозом «внебольничная пневмония» были назначены антибактериальная (цефтриаксон по 2 г в сутки внутримышечно) и патогенетическая терапия, на фоне которых отмечено некоторое улучшение, но лихорадка сохранялась. Больная самовольно покинула стационар. Через 2 дня появилась одышка, усилились слабость, недомогание, и 28 мая пациентка вновь обратилась в стационар и была госпитализирована.

При выяснении анамнеза жизни установлено, что больная беременна, срок беременности — 14 нед., но на учете по беременности не состоит. Беременность первая, желанная, в браке. Кроме того, в 2005 г. у пациентки была выявлена ВИЧ-инфекция, но, с ее слов, персонал лечебного учреждения отнесся к ней пренебрежительно, был груб, что вызвало у нее негативную реакцию, страх обращения за медицинской помощью, поэтому на диспансерные осмотры все эти годы она не являлась и лечение не получала. В 2015 г. перед вступлением в брак выполнила исследование на ВИЧ в анонимном кабинете. С ее слов, результат отрицательный, но на предъявленном бланке было указано: «Референтное значение: «отрицательно»; результат ПЦР РНК ВИЧ: 104607 копий/мл». Т. е. полученные данные больная трактовала ошибочно. Также перенесла 4 операции по поводу врожденной патологии (расщелина неба и губы), последняя из которых была в 2005 г.

Эпидемиологический анамнез не отягощен.

Объективно при поступлении состояние пациентки было расценено как среднетяжелое. Имелся дефицит массы тела (рост — 169 см, вес — 42 кг, индекс массы тела был равен 14,7 кг/м^2). Кожные покровы бледные, слизистая ротоглотки гиперемирована, зернистость задней стенки. Лимфатические узлы (подчелюстные, шейные, аксиллярные, паховые) увеличены до 0,7 см, безболезненны, подвижны. Со стороны дыхательной системы: перкуторно звук легочный, аускультативно дыхание жесткое, в нижних отделах ослаблено, хрипов нет. Тоны сердца приглушены. Язык обложен белым налетом. Живот увеличен в размере (за счет беременности). Другие органы и системы — без особенностей. По данным общего анализа крови, имелись признаки воспаления: нейтрофилез (92 %), лимфопения (6 %), высокая скорость оседания эритроцитов (75 мм/ч); по данным биохимического анализа крови, отмечены гипопротеинемия, небольшая гипертрансаминаземия; по данным общего анализа мочи, умеренная протеинурия (подробнее результаты анализов здесь и далее приведены на рисунке). Был выставлен диагноз: «Вирусная инфекция неуточненная, течение средней тяжести. Внебольничная пневмония? Болезнь, вызванная ВИЧ, с проявлением инфекционных заболеваний. Стадия 4Б, фаза прогрессирования без АРВТ. Генерализованная лимфаденопатия. Кахексия. Беременность 14 недель». Больной назначили цефтриаксон по 2,0 г в сутки внутривенно (в/в) капельно и патогенетическую терапию (в том числе инфузионно).

30 мая было отмечено ухудшение самочувствия пациентки: усиление одышки, слабости. Выявлено увеличение печени на 2,5 см. К терапии добавили глюкокортикостероиды (дексаметазон по 8 мг в сутки).

На следующий день, 31 мая, самочувствие У. продолжило ухудшаться: появились одышка в покое, сухой редкий кашель, боли в грудной клетке слева. Состояние было расценено как тяжелое. По результатам выполнения рентгенограммы легких вынесли заключение о двусторонней нижнедолевой полисегментарной пневмонии. Уточнили клинический диагноз: «Болезнь, вызванная ВИЧ, с проявлением бактериальной и грибковой инфекций. Стадия 4Б, фаза прогрессирования без АРВТ. Двусторонняя внебольничная полисегментарная пневмония (пневмоцистная?), тяжелое течение. ДН1. Кахексия. Кандидоз орофациальный. Беременность 14 недель». Изменили терапию: отменили цефтриаксон, назначили амоксиклав, ванкомицин, левофлоксацин, увеличили дозы глюкокортикостероидов, назначили кислородную поддержку, ингаляции сальбутамолом, отхаркивающие (флуимуцил), усилили инфузионную терапию (дозировки и способы введения здесь и далее указаны на рисунке). Были назначены дополнительные исследования, в т. ч. взятие мокроты (но взять не удалось). В течение дня состояние продолжало ухудшаться: SpO_2 — 73 %, частота сердцечных сокращений — 145 в минуту, снижение диуреза до 500 мл/сут. В связи с усилением легочно-сердечной недостаточности пациентку перевели в реанимационное отделение.

1 июня сохранялись жалобы на слабость и кашель, состояние оставалось тяжелым, но была отмечена положительная динамика. 2 июня нормализовалась температура

тела (36,4 °С). Был получен результат иммунологического и вирусологического исследований: $CD4^+$-Т-лимфоцитов — 4 клеток/мкл, $CD8^+$-Т-лимфоцитов — 116 клеток/мкл, CD4/CD8 — 0,03; ПЦР РНК ВИЧ — 1615358 копий/мкл. Результаты исследований на маркеры вирусных гепатитов были отрицательными. Были проведены консультации акушера-гинеколога («Беременность 14 недель. Показаний для прерывания беременности нет») и фтизиатра («Больше данных за двустороннюю неспецифическую пневмонию»). Назначили туберкулиновые пробы и забор мокроты на *Mycobaterium tuberculosis* (3-кратно). 3 июня пациентка была переведена в инфекционное отделение. Исследование мокроты не было выполнено из-за отсутствия материала.

К 9 июня сохранялись жалобы на кашель и слабость. Жизненные показатели были в норме, в т. ч. температура тела. По результатам повторной рентгенографии легких сделали заключение о двусторонней нижнедолевой полисегментарной пневмонии в стадии разрешения. Отменили кислородную поддержку. На следующий день по настоянию больной выписали ее на амбулаторное лечение (с улучшением).

14 июня У. была осмотрена врачом-инфекционистом в Центре по профилактике и борьбе со СПИД. Пациентка жаловалась на сухой кашель, слабость и повышение температуры до 38,5 °С с 11 июня. Гинеколог подтвердил наличие беременности 16–17 нед. Общий анализ крови выявил тромбоцитопению, лейкопению, лимфопению и нейтрофилез. Больной назначена АРВТ (рисунок). 15 июня температура тела повысилась до 40 °С. У. была направлена на повторную госпитализацию в инфекционный стационар.

При поступлении в стационар состояние больной было расценено как тяжелое. Отмечены тахикардия и низкое артериальное давление; выступ печени на 2 см из-под края реберной дуги; сниженный диурез; анемия, нейтрофилез, лимфопения; нарастание лабораторного иммунодефицита. Пациентку перевели в реанимационное отделение. Назначили антибиотикотерапию (цефтриаксон, амоксиклав, клиндамицин), противогрибковый препарат флюконазол, дексаметазон, патогенетическую терапию. В последующие дни температура тела нормализовалась, жизненные показатели были стабильными, парциальное давление кислорода было в норме.

20 июня появились боли в грудной клетке слева (в области сердца), вновь повысилась температура тела (38,2–38,6 °С). На электрокардиограмме зафиксировали синусовую тахикардию. На следующий день боли в грудной клетке стали сильнее. По результатам рентгенографии легких сделали заключение о двусторонней нижнедолевой пневмонии в стадии разрешения. Выставили диагноз: «Двусторонняя внебольничная пневмония, тяжелое течение. ДН1. Инфекционный эндокардит, тяжелое течение. Легочно-сердечная недостаточность I–II. Болезнь, вызванная ВИЧ, с проявлением бактериальной, грибковой инфекции, стадия 4В, фаза прогрессирования на фоне АРВТ. Генерализованная лимфаденопатия. Кахексия. Выраженный лабораторный иммунодефицит. Гипохромная анемия. Беременность 16–17 недель». 22 июня больная была переведена в кардиологическое отделение соматического стационара, где уточнили диагноз: «ВИЧ-инфекция, стадия 4В, фаза прогрессирования на фоне АРВТ. Генерализованная лимфаденопатия. Двусторонняя полисегментарная пневмония, тяжелое течение. Перикардит. Левосторонний плеврит. Дефицит массы тела более 30 %. Кахексия. Выраженный лабораторный иммунодефицит. Гипохромная анемия. Тромбоцитопения. Беременность 16–17 недель». Пациентка продолжала получать АРВТ, но отмечала плохую переносимость и нарушала режим приема препаратов.

27 июня методом ультразвукового исследования была установлена внутриутробная гибель плода. 29 июня беременность была прервана (на сроке 17–18 нед.). У больной продолжается лихорадка, в крови нарастает лейкоцитоз за счет палочкоядерных элементов.

30 июня выставлен диагноз: «Туберкулез легких. Экссудативный плеврит». Пациентка была направлена на стационарное лечение в противотуберкулезный диспансер, где назначили специфическую терапию по первому режиму (рифампицин + изониазид + этамбутол + пиразинамид). В связи с назначением рифампицина изменили схему АРВТ: отменили лопинавир/ритонавир и назначили эфавиренз.

27 июля больная продолжает лечение в противотуберкулезном стационаре. Клинический диагноз: «ВИЧ-инфекция, стадия 4В, фаза ремиссии на фоне АРТ. Диссеминированный туберкулез легких в фазе инфильтрации и распада. КУМ (-). Туберкулезный полисерозит. Перикардит. Правосторонний экссудативный туберкулезный плеврит. КУМ (+) в экссудате. Туберкулезный папиллит. КУМ (+) в моче. IA(МБТ+) ГДУ. Пневмоцистная пневмония в анамнезе. Персистирующий оральный кандидоз. Выраженный лабораторный иммунодефицит». Иммунологически, вирусологически — положительная динамика.

26 августа стало известно, что пациентка уехала на лечение в другой регион (г. Москва). В связи с этим данных о дальнейшем течении заболевания нет. Однако позже было получено сообщение от мужа, что 6 октября пациентка умерла. Диагноз патологоанатомический: «Генерализованный туберкулез». Диагноз по МКБ X: «Болезнь, вызванная ВИЧ, с проявлением микобактериальной инфекции».

Обсуждение клинического случая

Описанный клинический случай не является типичным. Больная социально вполне благополучна, тем не менее, зная о своем инфицировании ВИЧ, не только не посещала диспансерные осмотры, но и длительно не обращалась за помощью, когда в ней возникла острая необходимость. Отрицание, которое является естественной психологической реакцией на сообщение диагноза серьезного заболевания и обычно заканчивается его принятием, у пациентки У. растянулось на многие годы. Очевидно, что этому способствовал первый негативный опыт взаимодействия с медиками. К сожалению, такой опыт — не редкость среди ВИЧ-инфицированных. По нашим данным, 64 % людей, живущих с ВИЧ, сталкивались с неэтичным поведением медицинских работников, причем 21 % — часто [18].

Можно предположить, что этот же фактор сыграл роль в том, что пациентка отказалась от ранней постановки на учет по беременности, что также способствовало ее неблагоприятному исходу. Право женщины самостоятельно решать вопрос о материнстве закреплено законодательно, и ВИЧ-инфицированная женщина, как и любая другая, может родить, если хочет [19]. Но наличие ВИЧ-инфекции накладывает на нее определенные обязательства: для рождения здорового ребенка она должна придерживаться разработанных рекомендаций, прежде всего — получать антиретровирусные препараты [1, 5, 6]. В данном случае, несмотря на то, что имело место осознанное желание

20.05 Госпитализация пациентки в стационар
Диагноз: внебольничная пневмония
Лечение: цефтриаксон (2 г/сут, в/м)

24.05 Пациентка самовольно покинула стационар

28.05 Госпитализация пациентки в инфекционный стационар
Диагноз: вирусная инфекция неуточненная, течение средней тяжести; ВИЧ-инфекция, стадия 4Б, фаза прогрессирования без АРВТ
Лечение: ⊕ цефтриаксон (2 г/сут, в/в капельно);
⊕ патогенетическая терапия (в т. ч. инфузионно)

Результаты анализов
— 20 — 88 — 130 — 90/60
нейтрофилы — 92 %
лимфоциты — 6 %
СОЭ — 75 мм/ч
белок — 50 г/л
АлАТ — 0,1 мкмоль/(ч•мл)
белок — 0,5 г/л

30.05 Ухудшение самочувствия
Лечение: ⊕ дексаметазон (8 мг/сут)

Результаты анализов
— 22 — 87 — 125

31.05 Ухудшение самочувствия. Состояния тяжелое. Перевод в реанимацию
Выполнена рентгенография легких
Заключение: двусторонняя нижнедолевая полисегментарная пневмония
Лечение: ⊖ цефтриаксон
⊕ амоксиклав (1,2 г/сут, в/в капельно)
⊕ ванкомицин (1,0 г × 2 р/сут, в/в капельно)
⊕ левофлоксацин (500 мг/сут, в/в капельно)
⊕ преднизолон (30 мг × 3 р/сут)
⊕ дексаметазон (8 мг × 2 р/сут)
⊕ кислородная поддержка
⊕ флуимуцил
⊕ патогенетическая терапия

Результаты анализов
— 26 — 80 — 124 — 110/70
В конце дня: — 73 — 145

01.06

Результаты анализов
— 24 — 90 — 110 — 120/60

02.06

Результаты анализов
— 22 — 92 — 88 — 100/60
CD4 — 4 кл./мкл CD8 — 116 кл./мкл CD4/CD8 — 0,03

03.06 Перевод в инфекционный стационар

Результаты анализов
— 18 — 93 — 82 — 100/60
эритроциты — 3,45 × 10^{12}
нейтрофилы — 94 %
СОЭ — 61 мм/ч
гемоглобин — 91 г/л
лимфоциты — 5 %

09.06 Повторная рентгенография легких
Заключение: двусторонняя нижнедолевая полисегментарная пневмония в стадии разрешения
Лечение: ⊖ кислородная поддержка

10.06 Пациентка выписана на амбулаторное лечение (с улучшением)

14.06 Осмотр в Центре по профилактике и борьбе со СПИД
Антиретровирусная терапия: ⊕ ламивудин (3TC) (150 мг × 2 р/сут)
⊕ ставудин (d4T) (30 мг × 2 р/сут)
⊕ калетра (LPV/r) (2 таб. × 2 р/сут)

Результаты анализов
тромбоциты — 82 × 10^9
лейкоциты — 3,8 × 10^9
лимфоциты — 4 %
нейтрофилы — 94 %

16.06 Повторная госпитализация в инфекционный стационар. Перевод в реанимацию
Лечение: ⊕ цефтриаксон (1,0 г × 2 р/сут)
⊕ амоксиклав (1 таб. (875 + 125 мг) × 2 р/сут)
⊕ клиндамицин (200 мг × 2 р/сут)
⊕ флюконазол (200 мг, в/в капельно)
⊕ дексаметазон (8 мг)
⊕ патогенетическая терапия

Результаты анализов
— 24 — 128 — 90/60
эритроциты — 3,0 × 10^{12}
гемоглобин — 72 г/л
нейтрофилы — 94 %
лимфоциты — 4 %
СОЭ — 66 мм/ч
CD4 (абс.) — 1 кл./мкл CD8 — 36 кл./мкл CD4/CD8 — 0,03

20.06 Появление болей в области сердца

Результаты анализов
— 20 — 94 — 108 — в норме

21.06 Усиление болей в области сердца
Диагноз: двусторонняя внебольничная пневмония, тяжелое течение; эндокардит, тяжелое течение;
ВИЧ-инфекция, стадия 4В, фаза прогрессирования на фоне АРВТ

частота дыхания, в мин
парциальное давление O_2, %
частота серд. сокращений, в мин
артериальное давление, мм рт. ст.
общий анализ крови
биохимический анализ крови
общий анализ мочи
иммунный статус
назначение препарата
отмена препарата
увеличение дозировки
в/м — внутримышечно
в/в — внутривенно

22.06 Перевод в кардиологическое отделение
Пациентка нарушает режим приема АРВТ-препаратов
Диагноз: перикардит; левосторонний плеврит

27.06 Внутриутробная гибель плода

29.06 Прерывание беременности

30.06 Перевод в противотуберкулезный диспансер
Диагноз: туберкулез легких; экссудативный плерит
Противотуберкулезная терапия:
рифампицин + изониазид + этамбутол + пиразинамид
Антиретровирусная терапия: ⊖ калетра (LPV/r)
⊕ эфавиренз

Результаты анализов
эритроциты — 3,79 × 10^{12}
гемоглобин — 97 г/л
тромбоциты — 175 × 10^9
лейкоциты — 7,2 × 10^9
лимфоциты — 9,3 %
CD4 (абс.) — 9 кл./мкл CD8 — 281 кл./мкл CD4/CD8 — 0,03

27.07 Продолжение лечения в противотуберкулезном диспансере

26.08 Пациентка уехала на лечение в Москву

06.10 Пациентка погибла
Диагноз: генерализованный туберкулез

Краткая история болезни беременной женщины У., 31 год, больной ВИЧ-инфекцией

материнства (первая и при этом поздняя беременность, в браке), женщина нарушала режим приема препаратов после их назначения. Для повышения приверженности АРВТ следовало привлечь к работе с ней психолога, что является рутинной практикой при командном подходе к ведению такой категории больных [1]. Психо-эмоциональные проблемы у пациентки были выраженными, и консультации психолога были особенно необходимы. К сожалению, в стационарах специалисты данного профиля, как правило, отсутствуют. Психологическое сопровождение осуществляли муж, лечащие врачи, сотрудники медицинского университета.

Выбор схемы АРВТ в описанном случае был, по нашему мнению, обоснованным. Необходимо было не только предотвратить вертикальную передачу ВИЧ, но и сохранить жизнь пациентки, учитывая выраженный иммунодефицит ($CD4^+$-Т-лимфоцитов — 4 клетки/мкл). Использование одной из наиболее предпочтительных схем у беременных, включающей зидовудин, ламивудин и лопинавир/ритонавир, было невозможно ввиду наличия анемии. Именно поэтому вместо зидовудина был назначен ставудин. Указанная схема соответствует концепции АРВТ для больных с исходно низким (менее 50 клеток/мкл) количеством $CD4^+$-Т-лимфоцитов. Замена лопинавира на эфавиренз, связанная с плохой переносимость первого, была вполне допустима, т. к. к этому моменту больная находилась уже во 2-ом триместре беременности. Однако, учитывая еще и наличие туберкулеза на фоне исходно низкого количества $CD4^+$ (менее 100 клеток/мкл), согласно Национальным рекомендациям по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией, можно было добавить четвертый препарат — энфувиртид, который не обладает негативным влиянием на плод, но мог повысить эффективность АРВТ [5, 6].

Беременность осложнила и без того тяжелую ситуацию. Вызываемые ею изменения гормонального фона, на наш взгляд, могли усугубить иммунодефицит, который достиг у пациентки крайней степени, способствуя развитию вторичных инфекций. Самой опасной из них оказался туберкулез, который и стал причиной гибели больной.

Как известно, течение туберкулеза на фоне иммунодефицита протекает не совсем типично [1, 20–22]. При содержании $CD4^+$-Т-лимфоцитов ниже 500 клеток/мкл заболевание развивается быстрее, реже выявляются деструктивные формы, в патологический процесс чаще вовлекаются серозные оболочки. При содержании $CD4^+$ Т-лимфоцитов ниже 350 клеток/мкл особенностью туберкулеза органов дыхания становится склонность к поражению плевры, перикарда, ниже 200 клеток/мкл — милиарная и лимфогенная диссеминация с полиорганным поражением, выраженный изнуряющий синдром, лихорадка [1]. Все эти признаки были отмечены у пациентки У. При развитии глубокого иммунодефицита (менее 100 $CD4^+$-Т-лимфоцитов/мкл) течение туберкулезной инфекции часто (до 40 % случаев) сопровождается развитием других вторичных заболеваний, что еще более затрудняет диагностику. В связи с практически полной утратой признаков продуктивного гранулематозного воспаления туберкулез у таких больных морфологически и клинически приобретает пневмониеподобное течение. В 30 % случаев яркая клиническая картина на 4–8 нед. опережает появление диссеминации, при этом у некоторых пациентов изменений на рентгенограмме нет [1]. Если вернуться к рассматриваемому клиническому случаю, то процесс протекал именно так. Поскольку рентгенологиченская картина, туберкулинодиагностика и диаскин-тест на фоне выраженного иммунодефицита становятся малоинформативными, для своевременного выявления туберкулеза приобретают особое значение морфологическое, бактериоскопическое и бактериологическое, а также молекулярно-генетическое исследования биологических жидкостей и биоптатов. Но и они, как показано в настоящем случае, не всегда выполнимы и/или не всегда дают быстрый результат. Трудности диагностики, высокая вероятность генерализации туберкулезного процесса при значительном иммунодефиците являются основанием для назначения пациентам с содержанием $CD4^+$-Т-лимфоцитов менее 200 клеток/мкл превентивного лечения [6]. По нашему мнению, уже в начале стационарного лечения пациентки У. были серьезные основания предположить у нее наличие поражения дыхательной системы смешанной этиологии, включающей туберкулезную (несмотря на отсутствие типичной рентгенологической картины), и рассмотреть вопрос о применении терапии *ex juvantibus*.

Скрытому на первых порах течению туберкулеза могло способствовать и наличие сопутствующего поражения пневмоцистной этиологии. Хотя *Pneumocystis jiroveci* не были обнаружены и диагноз не был подтвержден лабораторными методами, клинически в пользу данной патологии свидетельствовали постепенно нарастающая дыхательная недостаточность (и при этом скудность физикальных данных), высокие показатели СОЭ, низкие показатели SpO_2 (до 73 %), а также положительный эффект от терапии клиндамицином и глюкокортикостероидами.

Серьезное полиэтиологическое поражение легких, а именно: гипоксия как результат легочно-сердечной недостаточности, развившейся у больной, — стало, как нам представляется, одной из главных причин внутриутробной гибели плода. Немаловажным было и общее истощение, проявлявшееся не только значительным снижением массы тела, но и астеническим синдромом, анемией, гипопротеинемией. Риск самопроизвольного прерывания беременности в данном случае можно оценить как очень высокий. Но даже при условии ее сохранения, была значительной вероятность серьезных последствий для здоровья ребенка. По данным одного из исследований, постгипоксические поражения ЦНС различной степени тяжести отмечались у 90,5 % детей, гематологические сдвиги в виде анемии легкой и средней степени тяжести — у 97,3 % детей [23]. В рассматриваемом случае женщина при желании могла не сохранять эту беременность. В перечне медицинских показаний для прерывания беременности ВИЧ-инфекция отсутствует, тем не менее в индивидуальных случаях, с учетом всех рисков и коллегиального рассмотрения (консилиума) прерывание беременности по этой причине возможно даже при сроке более 12 нед. С другой стороны, в этой ситуации операция может нанести существенный вред здоровью ВИЧ-инфицированной женщины и ухудшить прогноз основного заболевания [24, 25]. В любом случае выбор всегда остается за женщиной. Это трудное решение, и в подобных ситуациях, на наш взгляд, также обязательно психологическое сопровождение.

ВЫВОДЫ

Из описанного клинического наблюдения можно сделать ряд выводов.

Во-первых, необходимо проводить планомерную работу по повышению толерантности общества к людям,

живущим с ВИЧ, особенно в медицинской среде, что позволит увеличить эффективность взаимодействий «медицинский работник–пациент» и избежать неприятия лечения со стороны пациента.

Во-вторых, при ведении пациентов со сложным комплексом медицинских, психологических, этических проблем обязательно участие психолога, в том числе при стационарном лечении, для чего в штате инфекционного стационара следует предусмотреть наличие специалистов соответствующего профиля. В настоящее время при отсутствии в медицинском учреждении психолога его роль приходится исполнять лечащим врачам, которые не всегда располагают временем и обладают необходимой квалификацией. Можно рекомендовать привлечение в качестве психологов волонтеров из числа медицинских работников, студентов медицинских вузов (при письменном согласии пациентки), членов семьи, осведомленных о ВИЧ-инфицировании женщины.

В-третьих, залогом успеха ведения беременных женщин, больных ВИЧ-инфекцией, с выраженным иммунодефицитом является максимально полное и быстрое выявление вторичных заболеваний и их адекватное лечение. Важно помнить, что очень часто возникающие на таком фоне поражения органов и систем имеют полиэтиологический характер и, как правило, атипичное течение. Врачам следует иметь постоянную настороженность и максимально расширять диагностический поиск, используя все доступные методы. Лечение должно быть адекватным. В тех случаях, когда не удается добиться определения возбудителя инфекционного процесса, лечение назначается эмпирически, с учетом совокупности всех факторов. В отдельных случаях, с нашей точки зрения, оправдано применение терапии *ex juvantibus*.

Наконец, несмотря на все усилия специалистов, успех гарантирован не всегда. Беременных женщин, больных ВИЧ-инфекцией, с выраженным иммунодефицитом необходимо осведомлять о возможных рисках. Для их оценки следует систематически проводить сбор и обобщение информации, для чего полезна автоматизация сбора данных, ее широкое внедрение в рутинную практику.

Литература

1. Покровский В. В., редактор. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. 608 с.
2. Мордык А. В., Пузырева Л. В., Довгополюк Е. С., Левахина Л. И. Анализ ситуации по ведению беременных женщин с ВИЧ-инфекцией на территории Сибирского федерального округа за период с 2005 по 2013 гг. Мед. альманах. 2015; 5 (40): 89–92.
3. Иоанниди Е. А., Осипов А. В., Бондаренко А. И. Эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфекции у беременных в Волгоградской области. Вестн. ВолгГМУ. 2016; 2 (58): 45–7.
4. Дереглазова Ю. А., Жебелева Ю. А., Овсяникова А. В. Реализация репродуктивной функции у ВИЧ-инфицированных женщин Пермского края. Наука и Мир. 2015; 3 (5): 89–90.
5. Афонина Л. Ю., Воронин Е. Е., Фомин Ю. А., Козырина Ю. А., Юрин О. Г., Покровский В. В. Применение антиретровирусных препаратов в комплексе мер, направленных на профилактику передачи ВИЧ от матери ребенку. Клинический протокол. Эпидемиол. и инфекц. бол. Актуальн. вопр. 2013; (3 Прилож.): 1–16.
6. Покровский В. В., Юрин О. Г., Кравченко А. В., Беляева В. В., Ермак Т. Н., Канестри В. Г. и др. Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией. Эпидемиол. и инфекц. бол. Актуальн. вопр. 2015; (6 Прилож.). 72 с.
7. Ульянич А. Л., Ишмухаметова Л. Э. Особенности психического состояния и мотивов сохранения беременности у беременных женщин с ВИЧ-положительным статусом. В сб.: Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции: Материалы Международной научно-практической конференции; 30–31 мая 2016 г.; Санкт-Петербург, Россия. СПб.: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье»; 2016. с. 184–8.
8. Коваленко С. Н., Романцов М. Г., Грибанова С. В. Структура самоосознания ВИЧ-инфицированных беременных женщин. Фунд. исслед. 2010; (3): 62–7.
9. Яценко Д. С. Течение беременности, родов и состояние новорожденных у женщин, инфицированных ВИЧ-инфекцией. Бюл. мед. интернет-конф. 2015; 5 (5): 448.
10. Маринкин И. О., Поздняков И. М., Лузан О. Д., Стариков Н. В., Тимофеева Ю. С. Особенности течения беременности и родов у ВИЧ-серопозитивных женщин. Мед. и обр. в Сибири. 2015; (3): 71.
11. Каюкова С. И., Демихова О. В., Бессараб Т. П., Корнилова З. Х., Амансахедов Р. Б., Идрисова Л. С. Ведение беременности и родов у пациентки с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом множественных локализаций (клиническое наблюдение). Рос. вестн. акуш.-гин. 2013; 13 (6): 65–9.
12. Джонсон Дж. Особенности беременности при ВИЧ-инфекции. Мед. наука Армении. 2012; 52 (1): 116–24.
13. Шалонина Т. Г., Костян И. Р., Алехина К. А. Особенности исходов беременности и родов у ВИЧ-инфицированных женщин. В сб.: Материалы III Южно-Уральского форума перинатологов, акушеров-гинекологов, неонатологов; 11 ноября 2016 г.; Челябинск, Россия. Челябинск: Изд-во ЮУГМУ; 2016. с. 36–9.
14. Рыбакова Т. Н. Течение беременности и родов у ВИЧ-инфицированных женщин. Арх. акуш. и гин. им. В. Ф. Снегирева. 2016; 3 (4): 215–6.
15. Сизова Н. В., Самарина А. В., Ефимов Г. А. Назначение антиретровирусной терапии женщинам в различные периоды жизни. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013; 5 (3): 34–41.
16. Беляков Н. А., Рахманина Н. Ю., Рахманова А. Г., редакторы. Женщина, ребенок и ВИЧ. Сер. Библиотека журнала «ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии». СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр; 2012.
17. Мельников А. С., Рукояткина Е. А., Фунден Р. А., Латышева И. Б. Женщина и ВИЧ-инфекция, современное состояние проблемы. Педиатр. 2015; 6 (1): 5–10.
18. Чернявская О. А., Иоанниди Е. А. Влияние характера ролевых интеракций «медицинский работник–пациент» на субъективную оценку качества медицинской помощи людям, живущим с ВИЧ. Мед. вестн. Юга России. 2015; (4): 94–9.
19. Масленцева Н. Ю. ВИЧ-положительные женщины: между стигмой и правом. Актуальн. вопр. совр. науки. 2015; 2 (6): 95–9.
20. Викторова И. Б., Нестеренко А. В., Зимина В. Н. Коинфекция (ВИЧ-инфекция/туберкулез) у беременных женщин. Туберк. и бол. легких. 2015; (12): 8–18.
21. Сахелашвили М. И., Савула М. М., Буртняк Т. В., Майовецкая Н. С., Остапюк Л. Р., Павленко М. Л. и др. Особенности течения ВИЧ-ассоциированного туберкулеза у беременных. Туберк., легочн. бол., ВИЧ-инфекция. 2010; 3 (3): 064–7.
22. Голубовская О. А., Климанская Л. А., Юрченко А. В., Федоренко С. В., Рудюк Н. М., Сукач М. М. Коинфекция ВИЧ/туберкулез: некоторые особенности течения. Клин. инфектол. и паразитол. 2015; 1 (12): 79–88.
23. Пышкина Т. В., Новичков Д. А., Турищева М. А., Аристанбе-

кова М. С. Факторы риска во время беременности и в родах у женщин с ВИЧ-инфекцией. Бюл. мед. интернет-конф. 2013; 3 (2): 68.
24. Аксенова-Сорохтей Ю. Н., Кузнецова Т. А., Бабаян В. Л. Искусственное прерывание беременности при ВИЧ-статусе (медико-правовой аспект). Журн. науч. и приклад. исслед. 2016; (3): 74–7.
25. Кадырова А. Ф., Лунченков Н. Ю., Бардовский С. П. Влияние положительного ВИЧ-статуса женщины на решение о сохранении или прерывании беременности. Вестн. РГМУ. 2015; (2): 40–1.

References

1. Pokrovskii VV, editor. VICh-infektsiya i SPID. National guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. 608 p. Russian.
2. Mordyk AV, Puzyreva LV, Dovgopolyuk ES, Levakhina LI. [Analysis of situation of pregnancy administration in the case of HIV positive women in the territory of Siberia Federal District in the period from 2005 to 2013]. Medicinskij al'manah. 2015; 5 (40): 89–92. Russian.
3. Ioannidi EA, Osipov AV, Bondarenko AI. [Epidemiological profile of HIV-infected pregnant women in the Volgograd region]. Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2016; 2 (58): 45–7. Russian.
4. Dereglazova YuA, Zhebeleva YuA, Ovsyanikova AV. [Reproductive function implementation at HIV infected women of Perm krai]. Nauka i Mir. 2015; 3 (5): 89–90. Russian.
5. Afonina LYu, Voronin EE, Fomin YuA, Kozyrina YuA, Yurin OG, Pokrovskii VV. Primenenie antiretrovirusnykh preparatov v komplekse mer, napravlennykh na profilaktiku peredachi VICh ot materi rebenku. Clinical protocol. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy. 2013; (3 Suppl): 1–16. Russian.
6. Pokrovskii VV, Yurin OG, Kravchenko AV, Belyaeva VV, Ermak TN, Kanestri VG, et al. Natsional'nye rekomendatsii po dispansernomu nablyudeniyu i lecheniyu bol'nykh VICh-infektsiei. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy. 2015; (6 Suppl). 72 p. Russian.
7. Ul'yanich AL, Ishmukhametova LE. Osobennosti psikhicheskogo sostoyaniya i motivov sokhraneniya beremennosti u beremennykh zhenshchin s VICh-polozhitel'nym statusom. In: Aktual'nye voprosy VICh-infektsii: Proceedings of the International Theoretical and Practical Conference; 2016 May 30–31; Saint-Petersburg, Russia. St. Petersburg: Sankt-Peterburgskaya obshchestvennaya organizatsiya “Chelovek i ego zdorov'e”; 2016. p. 184–8. Russian.
8. Kovalenko SN, Romantsov MG, Gribanova SV. [Structure of self-comprehension of HIV-infected of pregnant women]. Fundamental'nye issledovaniya. 2010; (3): 62–7. Russian.
9. Yatsenko DS. Techenie beremennosti, rodov i sostoyanie novorozhdennykh u zhenshchin, infitsirovannykh VICh-infektsiei. Bûlleten’ medicinskih internet-konferencij. 2015; 5 (5): 448. Russian.
10. Marinkin VO, Pozdnyakov IM,. Luzan OD, Starikov NV, Timofeeva JS. [Features of gestation course and labors at HIV-seropositive women]. Meditsina i obrazovanie v Sibiri. 2015; (3): 71. Russian.
11. Kaiukova SI, Demikhova OV, Bessarab TP, Kornilova ZKh, Amansakhedov RB, Idrisova LS. [Pregnancy and labor management in a patient with HIV infection and tuberculosis at multiple sites (a clinical observation)]. Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa. 2013; 13 (6): 65–9. Russian.
12. Jonson J. [Peculiarities of pregnancy in HIV cases]. Meditsinskaya nauka Armenii. 2012; 52 (1): 116–24. Russian.
13. Shalonina TG, Kostyan IR, Alekhina KA. Osobennosti iskhodov beremennosti i rodov u VICh-infitsirovannykh zhenshchin. In: Materialy III Yuzhno-Ural'skogo foruma perinatologov, akusherov-ginekolov, neonatologov; 2016 Nov 11; Chelyabinsk, Russia. Chelyabinsk: South-Ural State Medical University Press; 2016. p. 36–9. Russian.
14. Rybakova TN. Techenie beremennosti i rodov u VICh-infitsirovannykh zhenshchin. Arkhiv akusherstva i ginekologii imeni VF Snegireva. 2016; 3 (4): 215–6. Russian.
15. Sizova NV, Samarina AV, Yefimov GA. [Art prescription to women at different life periods]. VICh-infektsiya i immunosupressii. 2013; 5 (3): 34–41. Russian.
16. Belyakov NA, Rakhmanina NYu, Rakhmanova AG, editors. Zhenshchina, rebenok i VICh. Series of Biblioteka zhurnala “VICh-infektsiya i immunosupressii”. St. Petersburg: Baltiiskii meditsinskii obrazovatel'nyi tsentr; 2012. Russian.
17. Mel'nikov AS, Rukoyatkina EA, Funden RA, Latysheva IB. [Women and HIV infection, current status of the problem]. Pediatr. 2015; 6 (1): 5–10. Russian.
18. Chernyavskaya OA, Ioannidi EA. [The influence of character of role interaction «the medical worker–patient» on value judgment of quality of medical care to the people living with HIV]. Meditsinskii vestnik Yuga Rossii. 2015; (4): 94–9. Russian.
19. Maslentseva NY. [HIV-positive women: between stigmy and the right]. Aktual'nye voprosy sovremennoi nauki. 2015; 2 (6): 95–9. Russian.
20. Viktorova IB, Nesterenko AV, Zimina VN. [Co-infection (HIV/tuberculosis) in pregnant women]. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2015; (12): 8–18. Russian.
21. Sakhelashvili MI, Savula MM, Burtnjak TV, Majovetska NS, Ostapjuk LR, Pavlenko ML, et al. [Peculiarities of the course of HIV-associated tuberculosis in pregnant women]. Tuberkulez, legochnye bolezni, VICh-infektsiya. 2010; 3 (3): 064–7. Russian.
22. Golubovska O, Klymanska L, Yurchenko A, Fedorenko S, Rudyuk N, Sukach M. [HIV/tuberculosis coinfection: some peculiarities of clinical course]. Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya. 2015; 1 (12): 79–88. Russian.
23. Pyshkina TV, Novichkov DA, Turishcheva MA, Aristanbekova MS. Faktory riska vo vremya beremennosti i v rodakh u zhenshchin s VICh-infektsiei. Bûlleten’ medicinskih internet-konferencij. 2013; 3 (2): 68. Russian.
24. Aksenova-Sorokhtei YuN, Kuznetsova TA, Babayan VL. Iskusstvennoe preryvanie beremennosti pri VICh-statuse (mediko-pravovoi aspekt). Zhurnal nauchnykh i prikladnykh issledovanii. 2016; (3): 74–7. Russian.
25. Kadyrova AF, Lunchenkov NY, Bordovsky SP. The influence of HIV status on woman’s decision to maintain or terminate pregnancy. Bulletin of Russian State Medical University. 2015; (2): 40–1.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

А. Ф. Олейник[1,2] ✉, В. Х. Фазылов[1,2], А. Т. Бешимов[1,2]

[1] Кафедра инфекционных болезней, медико-профилактический факультет, Казанский государственный медицинский университет, Казань

[2] Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Казань

Применение антиретровирусной терапии (АРВТ) при ВИЧ-инфекции позволило перевести заболевание в разряд терапевтически контролируемых. Основная цель АРВТ — увеличение продолжительности жизни пациента и сохранение ее качества. Она достигается снижением вирусной нагрузки (числа копий РНК ВИЧ в плазме крови), что приводит к росту числа CD4⁺-Т-лимфоцитов. Но терапия может быть неэффективной. В работе изучена частота случаев иммунологической (ИН), вирусологической (ВН) и клинической неэффективности АРВТ. В исследование включили 341 взрослого ВИЧ-инфицированного пациента, получавшего АРВТ, начатую на стадиях 3–4 заболевания, с вирусологической эффективностью как минимум в течение первого года лечения. Участников исследования наблюдали на протяжении 1–3 лет. ИН АРВТ определяли как увеличение числа клеток CD4⁺ менее чем на 50 клеток/мкл в год на фоне полной супрессии ВИЧ, ВН АРВТ — как число копий РНК ВИЧ выше порога определения через 6 мес от начала лечения. Частота случаев ИН АРВТ составила 14,0–15,9 % для одного года лечения и 22 % для трех лет наблюдений. Отмечено, что для последующего адекватного восстановления содержания Т-лимфоцитов CD4⁺ необходимо увеличение их числа в первый год терапии более чем на 100 клеток/мкл. Вирусологически эффективной АРВТ была для 92,7 % пациентов. Большая часть (80 %) случаев ВН АРВТ была обусловлена низкой приверженностью пациентов к лечению. Клиническая эффективность АРВТ составила 91 % и в значительной степени определялась числом участников исследования с ИН АРВТ. Иммунологическая неэффективность АРВТ является фактором риска прогрессирования заболевания на фоне АРВТ и смерти при ВИЧ-инфекции. Риск клинического прогрессирования ВИЧ-инфекции при ИН АРВТ выше в 6,232 раз (95 % ДИ 3,106–12,51).

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, клиническая эффективность, вирусологическая эффективность, иммунологическая эффективность, неэффективность терапии

Благодарности: авторы благодарят Нияза Галиуллина и Фираю Нагимову за возможность проведения исследования на базе Республиканского центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Казань).

✉ **Для корреспонденции:** Олейник Альфия Фаридовна
пр-т Победы, д. 83, г. Казань, 420140; aalfons@yandex.ru

Статья получена: 31.01.2017 **Статья принята в печать:** 16.02.2017

CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND VIROLOGICAL INDICATORS OF ANTIRETROVIRAL THERAPY EFFICIENCY

Oleynik AF[1,2] ✉, Fazylov VH[1,2], Beshimov AT[1,2]

[1] Department of Infectious Diseases, Medico-Prophylactic Faculty, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

[2] Republic Center of AIDS and Infectious Diseases Prevention and Treatment, Kazan, Russia

Antiretroviral therapy (ART) for HIV-positive patients allowed labeling the disease a therapeutically controlled one. The main goal of ART is to prolong patient's life and preserve its quality. This is accomplished through viral load reduction (decrease of the number of HIV-RNA copies in blood plasma), which leads to the growing numbers of CD4⁺-T-lymphocytes. However, ART can be ineffective. In 2010–1014, we conducted an observational cohort retro/prospective study aimed at learning how often ART can be ineffective from immunological (II), virological (VI) and clinical points of view. The study was carried out at the premises of the Republic Center of AIDS and Infectious Diseases (Kazan, Russia). The study included 341 adult HIV-positive patients subjected to ART at 3rd and 4th stages of disease's development, with the treatment virologically efficient at least during the first year. The observation period was 1 to 3 years. ART was considered II (immunologically inefficient) when the number of CD4⁺ increased for less than 50 cells/mcl through the year with HIV completely suppressed. VI (virological inefficiency) of ART was registered if the number of HIV RNA copies was above the definition threshold after 6 months of treatment. ART was II in 14.0–15.9 % of cases after a year of treatment and in 22 % of cases after three years. It was noted that subsequent restoration of an adequate number of T-lymphocytes CD4⁺ required they overcame the threshold of 100 cells/mcl within the 1st year of treatment. Virologically, ART was effective for 92.7 % for patients. Most (80 %) cases of VI of ART were results of patients' lax attitude towards treatment. Clinically, ART helped 91 % of patients; this result largely depended on the number participants for whom ART was II. II of ART is a risk factor, the risk being progression of the disease with active ART in the background and death of the HIV-positive individual. II of ART makes the risk of clinical progression of HIV 6.232 times higher (95 % CI 3.106–12.51).

Keywords: HIV, antiretroviral therapy, clinical efficacy, virological efficacy, immunological efficacy, therapy failure

Acknowledgements: authors thank Niyaz Galiullin and Firaya Nagimova for the opportunity to conduct the study study at the Republic Center of AIDS and Infectious Diseases Prevention and Treatment (Kazan, Russia).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alfiya Oleynik
prospekt Pobedy, d. 83, Kazan, Russia, 420140; aalfons@yandex.ru

Received: 31.01.2017 **Accepted:** 16.02.2017

Основной целью антиретровирусной терапии (АРВТ) является увеличение продолжительности жизни пациента и сохранение ее качества. Клиническая неэффективность АРВТ заключается в развитии у пациента новой оппортунистической инфекции через 3–6 месяцев с начала терапии. Таким образом, оценить результативность АРВТ можно только в долгосрочных исследованиях.

Важные аспекты АРВТ, определяющие уровень выживаемости пациентов с ВИЧ-инфекцией, — вирусологический и иммунологический ответы на терапию. Вирусологическая задача — максимально снизить вирусную нагрузку в организме больного (предпочтительно до < 50 копий РНК вируса/мл) и удерживать ее на этом уровне как можно дольше, чтобы остановить прогрессирование заболевания и предотвратить формирование устойчивости вируса к препаратам. Вирусологическая неэффективность АРВТ увеличивает риск прогрессирования ВИЧ-инфекции в несколько раз [1, 2]. Об иммунологическом успехе АРВТ свидетельствует повышение содержания $CD4^+$-Т-лимфоцитов в организме пациента на фоне лечения (увеличение числа клеток заметно выше при полной супрессии вируса). Иммунологическая неэффективность АРВТ (ИН АРВТ) наблюдается примерно у 15 % пациентов [3]: у них длительное время сохраняется иммунодефицит, несмотря на прием антиретровирусных препаратов, и это сопряжено с повышенным риском развития СПИД и не СПИД-индикаторных заболеваний [4].

Целью нашего исследования были оценка частоты случаев клинической, вирусологической и иммунологической неэффективности АРВТ и определение необходимых условий для достижения эффективности АРВТ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обсервационное когортное ретро/проспективное исследование было проведено в 2010–2014 гг. на базе Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Казань; далее — СПИД-центр). Исследование получило одобрение локального этического комитета (протокол заседания № 3 от 24.03.2015).

В работе использовали данные о взрослых пациентах с установленным диагнозом «ВИЧ-инфекция», находившихся на диспансерном наблюдении в СПИД-центре в 1999–2014 гг. Критерии включения в исследование были следующими: 1) АРВТ в течение не менее чем одного года, уровень содержания РНК ВИЧ в плазме крови — ниже порога определения через 6 мес с начала АРВТ и как минимум в течение первого года лечения; 2) АРВТ была начата на стадиях 3–4 по клинической классификации ВИЧ-инфекции, утвержденной Приказом Минздравсоцразвития РФ № 166 от 17.03.2006. Критериями исключения являлись: 1) детский возраст; 2) продолжительность АРВТ менее одного года; 3) определяемый уровень содержания РНК ВИЧ в плазме крови через 6 мес с начала АРВТ; 4) ВИЧ-инфекция в стадиях инкубации, первичных проявлений и терминальной; 5) получение одновременно АРВТ и противовирусной терапии (ПВТ) вирусного гепатита. Критериями досрочного выбытия из исследования были: 1) прекращение АРВТ; 2) определяемая вирусная нагрузка (содержание РНК ВИЧ), развившаяся после ранее достигнутой супрессии ВИЧ в плазме крови (для определения иммунологической эффективности АРВТ); 3) старт ПВТ вирусного гепатита при АРВТ; 4) смерть пациента. Все пациенты дали письменное информированное согласие на обследование и проведение АРВТ.

Наблюдали 341 ВИЧ-инфицированного пациента, из них 204 — мужчины. Возраст участников исследования составил 35 (32; 40) лет (здесь и далее при характеристике выборки данные приведены в виде медианы и межквартильного размаха). В 59,2 % случаев имел место парентеральный путь заражения. Стаж наблюдения в СПИД-центре до начала лечения — 5 (2; 9) лет. Доли пациентов с ВИЧ-инфекций различных стадий: стадия 3 — 34,6 %, 4А — 29,9 %, 4Б — 28,4 %, 4В — 7,1 %. Содержание Т-лимфоцитов $CD4^+$ в периферической крови до начала АРВТ — 186 (120; 277) клеток/мкл, содержание РНК ВИЧ в плазме крови — 93000 (22750; 280625) копий/мл.

Всем пациентам назначали АРВТ в соответствии с Методическими рекомендациями Минздравсоцразвития РФ № 7125-РХ от 29.12.2006, за ходом терапии наблюдали в течение 1–3 лет. Схема АРВТ первой линии содержала два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы (НИОТ), а в качестве третьего компонента использовали ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (ННИОТ), либо ингибитор протеазы (ИП), либо ингибитор интегразы (ИИ) (рис. 1).

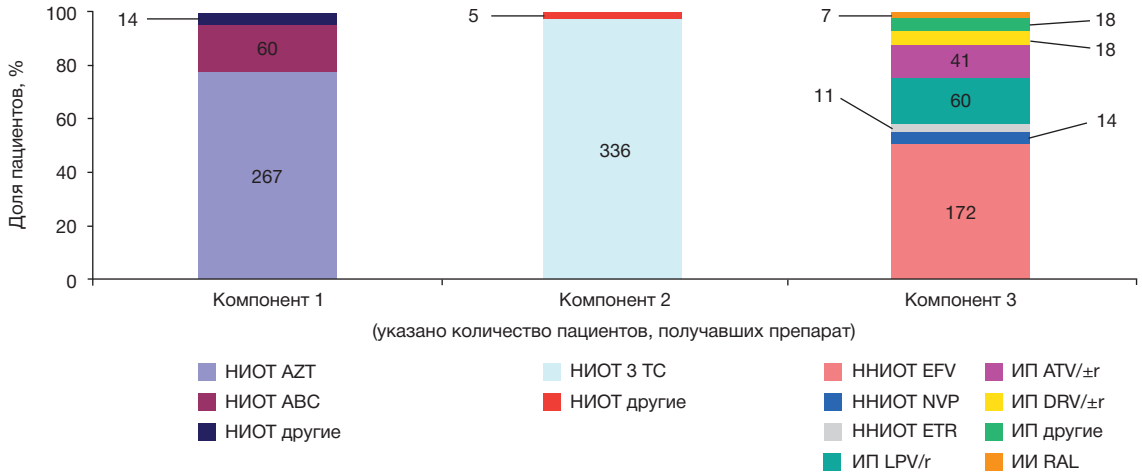


Рис. 1. Распределение пациентов по группам по типу назначенного препарата в рамках трехкомпонентной антиретровирусной терапии первой линии

НИОТ — нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы; ННИОТ — ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы; ИП — ингибитор протеазы; ИИ — ингибитор интегразы; AZT — азидотимидин; ABC — абакавир; НИОТ другие — ставудин, диданозин, фосфазид; 3TC — ламивудин; EFV — эфавиренз; NVP — невирапин; ETR — этравирин; LPV/r — лопинавир, бустированный ритонавиром; ATV/±r — атазанавир, бустированный/не бустированный ритонавиром; DRV/±r — дарунавир, бустированный/не бустированный ритонавиром; ИП другие — фосампренавир, саквинавир, индинавир, нелфинавир, ритонавир; RAL — ралтегравир.

Иммунологическую эффективность АРВТ оценивали по увеличению числа CD4⁺-Т-лимфоцитов. Пациенты были разделены на две группы: 1) с увеличением < 50 клеток/мкл за один год (отсутствие ответа на терапию); 2) с увеличением > 50 клеток/мкл за один год. Содержание CD4⁺-Т-лимфоцитов определяли как минимум дважды с разницей в измерениях в 3 мес для исключения случайной ошибки ввиду вариабельности абсолютных значений показателя.

Вирусологическую эффективность АРВТ оценивали не ранее чем на втором году терапии, т. к. неопределяемая вирусная нагрузка в течение первого года терапии являлась условием включения в исследование. Критерием вирусологической неэффективности являлось повышение уровня содержания РНК ВИЧ выше 400 копий/мл — до 2010 г. и выше 150 копий/мл — в последующие годы. Кратковременный подъем уровня содержания РНК ВИЧ, не превышавший 1000 копий/мл («всплеск», blip), не считали признаком неэффективности терапии.

Клиническую неэффективность АРВТ определяли как развитие новой оппортунистической инфекции через 3–6 мес с начала терапии. Воспалительный синдром восстановления иммунной системы не считали признаком неэффективности терапии.

Содержание CD4⁺-Т-лимфоцитов и РНК ВИЧ определяли в следующих временных точках: перед началом АРВТ, через 6 и 12 мес после начала АРВТ, далее — ежегодно на протяжении всего периода лечения. Количественное определение РНК ВИЧ в плазме крови выполняли методом полимеразной цепной реакции в «реальном времени» при помощи тестов Cobas Amplicor HIV-1 Monitor v.1.5 (Hoffman-La Roche, Швейцария) и LCx HIV RNA Quantitative assay (Abbott Laboratories, США) на анализаторах COBAS TaqMan 48 (Hoffman-La Roche) и Abbott m2000rt (Abbott Molecular, США) с порогом чувствительности 400 копий/мл — до 2010 г. и 150 копий/мл — в последующие годы. Резистентность ВИЧ к антиретровирусным препаратам определяли методом секвенирования при помощи теста ViroSeq HIV-1 Genotyping System (Applied Biosystems, США) на анализаторах Applied Biosystems 3100 и 3130 (Applied Biosystems). Количество CD4⁺-Т-лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител (мкАТ). Фенотипирование лимфоцитов проводили методом прямой реакции иммунофлуоресценции с Multitest 6-color TBNK Reagent (Becton Dickinson, США), содержащий мкАТ CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16/56⁺, CD19⁺, с учетом реакции иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре FACScanto II (Becton Dickinson).

Измерение эффекта воздействия фактора (иммунологической неэффективности АРВТ) на исход лечения (прогрессирование ВИЧ-инфекции, смерть) проводили за весь период терапии независимо от срока возникновения такого фактора.

Для статистической обработки результатов использовали методы описательной и сравнительной статистики и программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, США), Microsoft Excel 2003, OpenEpi 3.01 [5] . Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Равенство дисперсий распределения признаков — с помощью F-теста. В случае наличия распределения, отличного от нормального, для представления данных использовали медиану и межквартильный размах: Me (Q1; Q3). При сравнении независимых выборок для определения достоверности различий между группами использовали критерий Манна–Уитни. При сравнении нескольких независимых групп использовали H-критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп при помощи критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Для сравнения частот исходов высчитывали относительный риск (relative risk, RR) и 95 % доверительные интервалы. Отклонение нулевой гипотезы происходило при пороговом уровне статистической значимости p = 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунологическая неэффективность АРВТ

Число случаев иммунологической неэффективности АРВТ (ИН АРВТ) за трехлетний период составило 74 (22 %). Мы проанализировали сроки ее возникновения и динамику увеличения числа Т-лимфоцитов CD4⁺ в дальнейшем. В первый год АРВТ на терапию не ответили 48 пациентов из 341 (14 %), во второй — 41 из 261 (15,7 %), в третий — 31 из 195 (15,9 %). Данные о выбытии пациентов из исследования представлены в табл. 1.

Из 48 пациентов с иммунологической неэффективностью АРВТ в первый год лечения не ответили на терапию во второй год 24 (рис. 2), а ответили — 12 (оставшиеся 12 человек выбыли из исследования). Кроме того, во второй год в группу пациентов с иммунологической неэффективностью попали 17 участников исследования, у которых ранее происходило адекватное восстановление числа CD4⁺-Т-лимфоцитов. Из них 9 человек не ответили на терапию в третий год лечения. Таким образом, значительную часть пациентов с ИН АРВТ (66,7 %) во второй и третий

Таблица 1. Причины выбытия участников из исследования

Причина выбытия	Количество выбывших участников в разные сроки АРВТ, чел.							
	1-й год АРВТ		2-й год АРВТ		3-й год АРВТ		Всего за 3 года АРВТ	
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %
Самовольное прерывание АРВТ	–	–	19	5,6	11	3,2	30	8,8
Вирусологическая неэффективность АРВТ	–	–	18	5,3	7	2,1	25	7,3
Начало ПВТ	–	–	16	4,7	8	2,3	24	7,0
Смерть	–	–	7	2,1	5	1,5	12	3,5
Выбытие в другой регион	–	–	6	1,8	2	0,6	8	2,3
Недостаточный период наблюдения	–	–	14	4,1	33	9,7	47	13,8
Всего	–	–	80	23,5	66	19,4	146	42,8

Примечание. АРВТ — антиретровирусная терапия, ПВТ — противовирусная терапия вирусного гепатита.

годы лечения составили пациенты с ИН, развившейся в первый год.

Увеличение числа $CD4^+$-Т-лимфоцитов в первый год АРВТ составило: 1) 1 (–25; 22) клеток/мкл — в группе пациентов с ИН АРВТ и в первый, и во второй годы терапии; 2) 8 (–30; 17) клеток/мкл — в группе пациентов с ИН АРВТ в первый год и эффективным восстановлением числа $CD4^+$-Т-лимфоцитов во второй год; 3) 102 (77; 156) клеток/мкл — в группе пациентов с ИН АРВТ только во второй год; 4) 165 (83; 263) клеток/мкл — в группе пациенов, ответивших на терапию и в первый, и во второй годы лечения ($H = 80,6$ при $p < 0,001$; $p_{12} = 0,988$; $p_{13} < 0,001$; $p_{14} < 0,001$; $p_{23} < 0,001$; $p_{24} < 0,001$; $p_{34} = 0,125$).

Из 195 пациентов, которых наблюдали в течение всего исследования, на протяжении всех трех лет неэффективность лечения наблюдали у 12 человек, т. е. 6 % («абсолютные неответчики»), а на том или ином этапе лечения — у 27, т. е. 13,8 % («относительные неответчики»).

Вирусологическая неэффективность АРВТ

Из табл. 1 видно, что за два года лечения вирусологическая неэффективность АРВТ (ВН АРВТ) наблюдалась у 25 (7,3 %) пациентов. Во второй год ВН АРВТ зарегистрировали у большего числа пациентов, чем в третий: у 18 пациентов (5,3 %) против 7 (2,0 %) соответственно. У 20 (80 %) пациентов из 25 она была связана с нарушением приема препаратов, и после проведения работы над формированием приверженности к лечению вирусная нагрузка вновь становилась неопределяемой, замены схемы терапии не требовалось. У 5 (20 %) пациентов потребовалось изучить фармакорезистентность ВИЧ для подбора оптимального режима АРВТ. Для одного пациента не удалось ее определить, т. к. содержание РНК ВИЧ составляло менее 1000 копий/мл. У 2 пациентов не обнаружили устойчивости вируса к препаратам, поэтому была продолжена работа по формированию приверженности к лечению. У оставшихся 2 пациентов обнаружили множественную резистентность ВИЧ к препаратам классов НИОТ и ННИОТ, что потребовало замены схемы лечения. Таким образом, ВН АРВТ, связанная с устойчивостью вируса к препаратам, была зарегистрирована у 2 (0,6 %) участников исследования.

У 34 пациентов анализ резистентности вируса к препаратам был проведен до начала АРВТ (табл. 2.). У 3 пациентов была выявлена устойчивость сразу к двум классам препаратов (НИОТ/ННИОТ — 1, НИОТ/ИП — 2), у 2 — к одному (ННИОТ). Все пациенты с множественной резистентностью имели опыт неэффективного лечения (ВН) препаратами тех классов, к которым была выявлена устойчивость, в том числе перекрестная. Пациенты с резистентностью к препаратам одного класса не имели опыта АРВТ, но были заражены от партнера с ВН АРВТ. При этом перекрестная резистентность была констатирована у одного пациента.

Таким образом, существенный вклад в развитие ВН АРВТ вносит низкая приверженность пациента к лечению и фармакорезистентность вируса. Пациенты с опытом вирусологически неэффективного лечения чаще демонстрировали фармакорезистентность вируса множественного характера до начала АРВТ.

Клиническая неэффективность АРВТ

У 30 (9 %) пациентов было отмечено прогрессирование ВИЧ-инфекции на фоне АРВТ, из них более половины (62,5 %) — пациенты с ИН АРВТ. 7 (23 %) пациентов с клиническим прогрессированием ВИЧ-инфекции умерли в результате развившегося заболевания. Варианты клинического прогрессирования представлены в табл. 3.

У большинства пациентов с клинической неэффективностью АРВТ на 1–4 году терапии развился туберкулез, при этом в 11 (61 %) случаях туберкулез была ассоциирован с ИН АРВТ. Среднее содержание $CD4^+$-Т-лимфоцитов ($M \pm SD$), ассоциированное с клиническим прогрессированием ВИЧ-инфекции в виде туберкулеза — 277 ± 194 клеток/мкл, при этом минимальное значение показателя — 25 клеток/мкл, максимальное — 616 клеток/мкл. Среднее содержание $CD4^+$, при котором возникала герпетическая инфекция — 262 ± 81 клетки/мкл (минимальное и максимальное значения признака — 174 и 375 клеток/мкл соответственно). Кандидозный эзофагит был ассоциирован со средним содержанием $CD4^+$, равном 96 ± 41 клеток/мкл, волосистая лейкоплакия языка — 296 клеток/мкл, криптококкоз — 63 клетки/мкл, лимфома — 13 клеток/мкл.

Риск прогрессирования ВИЧ-инфекции при иммунологической неэффективности АРВТ выше в 6,232 раз (95 % ДИ 3,106–12,51).

За время проведения исследования умерло 13 пациентов. Среди причин смерти лидирующие позиции заняли туберкулез — 5 человек (38 %) и заболевания сердечно-сосудистой системы — 3 человека (23 %). Остальные случаи смерти были обусловлены криптококкозом, циррозом печени, онкологическим заболеванием, несчастным случаем и суицидом (по одному случаю). Половина умерших больных (7 случаев, 54 %) — «клинические прогрессоры» на фоне проводимой АРВТ. Риск смерти в группе пациентов с ИН АРВТ составил 18,6 %, в то время как в группе пациентов, ответивших на лечение, — 1,3 %. При оценке

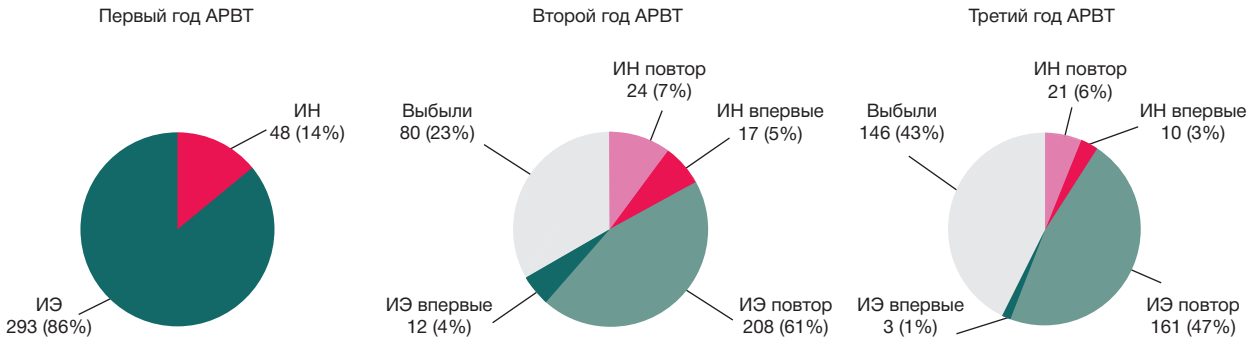


Рис. 2. Распределение пациентов по группам по типу иммунологического ответа на антиретровирусную терапию в разные сроки лечения (ИН — иммунологическая неэффективность, ИЭ — иммунологическая эффективность)

Таблица 2. Результаты исследования на фармакорезистентность ВИЧ к антиретровирусным препаратам (n = 34)

Резистентность ВИЧ к АРВТ	Количество пациентов с фармакорезистентностью ВИЧ к АРВТ, чел.																		
Обнаружена	5 (15 %)																		
	НИОТ							ННИОТ				ИП							
	AZT	3TC	ABC	TDF	FTC	ddI	d4T	EFV	NVP	ETR	DLV	LPV/r	DRV	ATV	SQV	FPV	IDV	NFV	TPV
	2	3	2	1	3	2	1	2	2	–	1	1	–	2	1	1	1	1	–
Не обнаружена	29 (85 %)																		

Примечание. АРВТ — антиретровирусная терапия; НИОТ — нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы; ННИОТ — ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы; ИП — ингибитор протеазы; AZT — азидотимидин; ABC — абакавир; 3TC — ламивудин; TDF — тенофовир; FTC — эмтрицитабин; ddI — диданозин; d4T — ставудин; EFV — эфавиренз; NVP — невирапин; ETR — этравирин; DLV — делавирдин; LPV/r — лопинавир, бустированный ритонавиром; DRV — дарунавир; ATV — атазанавир; SQV — саквинавир; FPV — фосампренавир; IDV — индинавир; NFV — нелфинавир; TPV — типранавир.

Таблица 3. Варианты клинического прогрессирования ВИЧ-инфекции на фоне антиретровирусной терапии (АРВТ) (n = 30)

Заболевание	Случаи прогрессирования ВИЧ-инфекции в разные сроки АРВТ									
	Всего		1-й год АРВТ		2-й год АРВТ		3-й год АРВТ		4-й год АРВТ	
	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %	абс.	отн., %
Туберкулез	18	60	5	17	7	23	3	10	3	10
Герпетическая инфекции	7	23	6	20	1	3	–	–	–	–
Кандидоз	3	10	3	10	–	–	–	–	–	–
Волосистая лейкоплакия языка	1	3	1	3	–	–	–	–	–	–
Криптококкоз	1	3	1	3	–	–	–	–	–	–
Лимфома	1	3	1	3	–	–	–	–	–	–
Всего	31	103	17	57	8	27	3	10	3	10

влияния иммунологической неэффективности АРВТ как фактора риска смерти пациента выявлено повышение риска смерти в 13,8 раз в группе пациентов с ИН АРВТ по сравнению с пациентами с эффективным увеличением числа CD4⁺-Т-лимфоцитов в результате терапии (p < 0,001; 95 % ДИ 4,359–44,07) и повышение риска смерти непосредственно от СПИД в 36,8 раза (p < 0,001; 95 % ДИ 4,42–307,6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным нашего исследования, частота случаев иммунологической неэффективности АРВТ за трехлетний период в целом составила 22 %, что превышает значение аналогичного показателя в работах российских [6] и зарубежных исследователей [3]. Вместе с тем при анализе частоты случаев ИН АРВТ за один год лечения мы получили сопоставимые значения: 14, 15,7 и 15,9 % — в нашем исследовании; 11,3 % — по данным Shmagel и соавт. [6]; 15 % — по данным Moore и соавт. [3]. Точность оценки требует наблюдения за пациентами, получающими АРВТ, в течение длительного периода, т. к. ежегодно ряды тех, кто не отвечает на терапию, могут пополняться новыми пациентами.

У части пациентов с «хорошим» иммунологическим ответом в первый год терапии по каким-то причинам не восстанавливалось число CD4+-Т-лимфоцитов в последующие годы терапии. Возможно, это связано с особенностями схемы АРВТ [7]. Также это может быть обусловлено развитием вторичных заболеваний во второй или третий годы АРВТ, на фоне которых восстановление числа CD4⁺ существенно ухудшается [8]. Однако в нашем исследовании лишь 3 пациента из 17 с ИН АРВТ во второй год терапии имели клиническое прогрессирование ВИЧ-инфекции в эти сроки. Возможно, предложенный нами критерий иммунологической неэффективности терапии для первого года должен быть иным, т. е. за признак эффективности лечения в этот период следует принимать более выраженный иммунный ответ, чем увеличение числа CD4⁺ на 50 клеток/год [9, 10]. Результаты анализа увеличения числа CD4⁺ за год терапии указывают на то, что в первый год прирост на уровне более 100 клеток/мкл укрепляет иммунологический «успех» терапии, на уровне менее 50 клеток/мкл — обуславливает в большинстве случаев (но не всегда) последующую неэффективность восстановления числа Т-лимфоцитов CD4⁺, на уровне 100 клеток/мкл — может считаться пограничным, неясным в плане прогноза развития иммунологической эффективности АРВТ.

Напомним, что отсутствие случаев вирусологической неэффективности АРВТ в первый год терапии связано с отбором пациентов в исследование: вирусологическая эффективность лечения как минимум в течение первого года являлась критерием включения. Вирусологическая эффективность АРВТ во второй и третий годы терапии составила 92,7 %, что совпадает с данными зарубежных авторов за сходный период наблюдения [11]. Так же, как и в других исследованиях, в большинстве случаев ВН АРВТ была вызвана нарушением режима приема препаратов (80 % случаев — в нашем исследовании, 56 % — в исследовании Klein и соавт. [12]). Только у 8 % (в нашем исследовании) и 9 % пациентов [12] была обнаружена резистентность вируса к препаратам. Исходная фармакорезистентность ВИЧ была обнаружена у 5 участников исследования из 34 обследованных по этому показателю. Это наблюдение обосновывает необходимость обследования на устойчивость вируса к препаратам до начала АРВТ, по крайней мере, пациентов, уже получавших вирусологически неэффективную антиретровирусную терапию, а также инфицированных от партнера с фармакорезистентностью ВИЧ, с целью подбора оптимального режима лечения.

Доля «клинических прогрессоров» на фоне АРВТ оказалась довольно высокой (9 %). У большинства пациентов

на 1–4 году терапии развился туберкулез, в 61 % всех случаев — у пациентов с ИН АРВТ. Мы полагаем, что туберкулез может оказывать неблагоприятное влияние на развитие ИН АРВТ, потому как треть (36,5 %) участников исследования, иммунная система которых не ответила на АРВТ, были больны туберкулезом, развившимся либо до начала АРВТ (22 % пациентов с ИН АРВТ), либо в процессе АРВТ (15 % пациентов с ИН АРВТ), тогда как частота случаев туберкулеза среди пациентов с иммунологической эффективностью АРВТ составила 12 % ($p < 0,001$). Другие варианты клинического прогрессирования ВИЧ-инфекции в основном возникали в первый год АРВТ. Вероятно, это связано с неблагоприятной эпидемической обстановкой по туберкулезу в России и пороговой величиной содержания $CD4^+$-Т-лимфоцитов, при которой возникают оппортунистические инфекции. С одной стороны, развитие новых вторичных заболеваний на фоне повышения количества $CD4^+$ нежелательно, т. к. ассоциировано с повышенным риском смерти и дополнительными затратами на лечение. С другой стороны, это свидетельствует о том, что иммунная система на фоне АРВТ восстанавливается. Среднее содержание $CD4^+$-Т-лимфоцитов, ассоциированное с клиническим прогрессированием ВИЧ-инфекции в виде туберкулеза, — 277 ± 194 клеток/мкл. Исходя из этого, чтобы избежать клинического прогрессирования, необходимо раньше начинать АРВТ (при содержании $CD4^+ >$ 350 клеток/мкл) и заниматься профилактикой вторичных заболеваний (в особенности туберкулеза).

Что касается риска клинического прогрессирования ВИЧ-инфекции при иммунологической неэффективности АРВТ, полученное нами значение (увеличение риска в 6,232 раза; 95 % ДИ 3,106–12,51) является промежуточным по сравнению со значениями, рассчитанными другими исследователями [2, 3].

ВЫВОДЫ

В нашем исследовании частота случаев иммунологической неэффективности АРВТ составила 14,0–15,9 % при расчете показателя для одного года терапии и 22 % — для трехлетнего периода. Из 195 человек, прошедших все исследование, у 12 пациентов (6 %) наблюдали ИН АРВТ во все годы терапии. Отмечено, что число случаев ИН АРВТ умеренно возрастает от первого года лечения к третьему и в значительной степени определяется количеством пациентов с ИН АРВТ после первого года лечения. Для последующего адекватного роста содержания Т-лимфоцитов $CD4^+$ необходимо увеличение их числа в первый год терапии более чем на 100 клеток/мкл. Этот уровень может использоваться на практике как критерий иммунологической эффективности АРВТ для своевременной коррекции лечения.

Вирусологическая эффективность АРВТ за два года составила 92,7 %, при этом неэффективное подавление вирусной нагрузки, связанное с низкой приверженностью пациентов к лечению, отметили у 6 % участников исследования, а с фармакорезистентностью вируса к антиретровирусным препаратам — у 0,6 %. Таким образом, качественная работа по формированию приверженности к лечению перед началом АРВТ может существенно повысить вирусологическую эффективность лечения. Выявленная исходная фармакорезистентность вируса (15%) была ассоциирована с опытом вирусологически неэффективной терапии или заражением от партнера с фармакорезистентностью вируса, что диктует необходимость обследования этой категории пациентов на резистентность ВИЧ к антиретровирусным препаратам до начала АРВТ.

Клиническая эффективность АРВТ составила 91 %. Она в значительной степени определяется долей пациентов с ИН АРВТ. Туберкулез являлся вариантом клинического прогрессирования ВИЧ-инфекции в 61 % случаев. Он ассоциирован с широким разбросом значений содержания $CD4^+$-Т-лимфоцитов (25–616 клеток/мкл), что указывает на необходимость более раннего начала АРВТ (при содержании $CD4^+$ на уровне > 350 клеток/мкл) и профилактики вторичных заболеваний.

ИН АРВТ является фактором риска прогрессирования ВИЧ-инфекции и смерти на фоне АРВТ. Это подтверждает необходимость своевременного распознавания феномена иммунологической неэффективности терапии для коррекции лечения.

Литература

1. Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Leport C, Kazatchkine MD, Costagliola D, et al. Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of highly active antiretroviral therapy. Ann Intern Med. 2000 Sep 19; 133 (6): 401–10.
2. Piketty C, Weiss L, Thomas F, Mohamed AS, Belec L, Kazatchkine MD. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a proteas inhibitor-containing regimen. J Infect Dis. 2001 May 1; 183 (9): 1328–35.
3. Moore DM, Hogg RS, Yip B, Wood E, Tyndall M, Braitstein P, et al. Discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy are associated with increased mortality and poor adherence to therapy. J Acquir Immune Defic Syndr. 2005 Nov 1; 40 (3): 288–93.
4. Gilson RJ, Man SL, Copas A, Rider A, Forsyth S, Hill T, et al. Discordant responses on starting highly active antiretroviral therapy: suboptimal CD4 increases despite early viral suppression in the UK Collaborativ HIV Cohort (UK CHIC) Study. HIV Med. 2010 Feb; 11 (2): 152–60.
5. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 3.01 [software], updated 2013 Apr 06 [cited 2017 Feb 03]. Available from: http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm.
6. Shmagel K, Shmagel N. Restoration of the number of CD4+ lymphocytes on different antiretroviral medicines and HAART regimens [abstract]. Proceedings of the 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention; 2011 July 17–20; Rome, Italy. CDB331.
7. Huttner AC, Kaufmann GR, Battegay M, Weber R, Opravil M. Treatment initiation with zidovudine-containing potent antiretroviral therapy impairs CD4 cell count recovery but not clinical efficacy. AIDS. 2007 May 11; 21 (8): 939–46.
8. Merlini E, Bai F, Bellistrì GM, Tincati C, d'Arminio Monforte A, Marchetti G. Evidence for Polymicrobic Flora Translocating in Peripheral Blood of HIV-Infected Patients with Poor Immune Response to Antiretroviral Therapy. PLoS One. 2011 Apr 11; 6 (4): e18580.
9. Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, et al. Characteristics, determinants, and clinical relevans of CD4 T cell recovery to <500 cell/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2005 Aug 1; 41 (3): 361–72.
10. Kelley CF, Kitchen CM, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM,

Kitahata M, et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. Clin Infect Dis. 2009 Mar 15; 48 (6): 787–94.
11. Singini I, Campbell TB, Smeaton LM, Kumarasamy N, La Rosa A, Taejareonkul S, et al. Predictors of late virologic failure after initial successful suppression of HIV replication on efavirenz-based antiretroviral therapy. HIV Clin Trials. 2016 Jul 29; 17 (5): 173–80.
12. Klein A, Vogel M, Schwarze-Zander C, Rockstroh J, Wasmuth J-C. Why not below the limit of detection? An analysis of the Bonn HIV cohort [abstract]. Proceedings of the EACS — 12th European AIDS Conference; 2009 Nov 11–14; Cologne, Germany. PE7.4/4.

References

1. Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Leport C, Kazatchkine MD, Costagliola D, et al. Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of highly active antiretroviral therapy. Ann Intern Med. 2000 Sep 19; 133 (6): 401–10.
2. Piketty C, Weiss L, Thomas F, Mohamed AS, Belec L, Kazatchkine MD. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a proteas inhibitor-containing regimen. J Infect Dis. 2001 May 1; 183 (9): 1328–35.
3. Moore DM, Hogg RS, Yip B, Wood E, Tyndall M, Braitstein P, et al. Discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy are associated with increased mortality and poor adherence to therapy. J Acquir Immune Defic Syndr. 2005 Nov 1; 40 (3): 288–93.
4. Gilson RJ, Man SL, Copas A, Rider A, Forsyth S, Hill T, et al. Discordant responses on starting highly active antiretroviral therapy: suboptimal CD4 increases despite early viral suppression in the UK Collaborativ HIV Cohort (UK CHIC) Study. HIV Med. 2010 Feb; 11 (2): 152–60.
5. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 3.01 [software], updated 2013 Apr 06 [cited 2017 Feb 03]. Available from: http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm.
6. Shmagel K, Shmagel N. Restoration of the number of CD4+ lymphocytes on different antiretroviral medicines and HAART regimens [abstract]. Proceedings of the 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention; 2011 July 17–20; Rome, Italy. CDB331.
7. Huttner AC, Kaufmann GR, Battegay M, Weber R, Opravil M. Treatment initiation with zidovudine-containing potent antiretroviral therapy impairs CD4 cell count recovery but not clinical efficacy. AIDS. 2007 May 11; 21 (8): 939–46.
8. Merlini E, Bai F, Bellistrì GM, Tincati C, d'Arminio Monforte A, Marchetti G. Evidence for Polymicrobic Flora Translocating in Peripheral Blood of HIV-Infected Patients with Poor Immune Response to Antiretroviral Therapy. PLoS One. 2011 Apr 11; 6 (4): e18580.
9. Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, et al. Characteristics, determinants, and clinical relevans of CD4 T cell recovery to <500 cell/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2005 Aug 1; 41 (3): 361–72.
10. Kelley CF, Kitchen CM, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. Clin Infect Dis. 2009 Mar 15; 48 (6): 787–94.
11. Singini I, Campbell TB, Smeaton LM, Kumarasamy N, La Rosa A, Taejareonkul S, et al. Predictors of late virologic failure after initial successful suppression of HIV replication on efavirenz-based antiretroviral therapy. HIV Clin Trials. 2016 Jul 29; 17 (5): 173–80.
12. Klein A, Vogel M, Schwarze-Zander C, Rockstroh J, Wasmuth J-C. Why not below the limit of detection? An analysis of the Bonn HIV cohort [abstract]. Proceedings of the EACS — 12th European AIDS Conference; 2009 Nov 11–14; Cologne, Germany. PE7.4/4.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОККУЛЬТНОГО ГЕПАТИТА В ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

Ж. Г. Еремеева[1] ✉, В. Х. Фазылов[2]

[1] Республиканский клинический кожно-венерологический диспансер, Казань

[2] Кафедра инфекционных болезней, медико-профилактический факультет, Казанский государственный медицинский университет, Казань

Эпидемиологическую опасность представляют лица с оккультным (латентным) гепатитом В. Исследование крови доноров только на поверхностный антиген вируса (hepatitis B virus, HBV) HBsAg не может обеспечить полную инфекционную безопасность крови, следствием чего может быть посттрансфузионная передача инфекции. Это объясняется тем, что вирус присутствует в организме даже при отрицательном HBsAg. В работе проанализированы данные 61 155 доноров Республиканского центра крови (Казань), полученные в 2010–2014 гг. Анализировали результаты тестирования на HBsAg, anti-HBc-total, anti-HBc IgM (методом иммуноферментного анализа) и определения ДНК вируса в крови (методом полимеразной цепной реакции в «реальном времени»). Установлено, что доноры с оккультным гепатитом В выявляются ежегодно, хотя и отмечена тенденция к снижению их числа. Для предотвращения распространения вируса в популяции рекомендуется ввести в стандарт диагностики HBV-инфекции определение маркера anti-HBc-total.

Ключевые слова: оккультный гепатит В, латентный гепатит В, HBV-инфекция, донор, кровь, иммуноферментый анализ, ПЦР-диагностика, HBsAg, anti-HBc-total, anti-HBc IgM

Благодарности: авторы благодарят Рамиля Тураева из Республиканского центра крови (Казань) за возможность работать с картами доноров и отчетными формами учреждения.

✉ **Для корреспонденции:** Еремеева Жанна Григорьевна
пр-т Победы, д. 39, кв. 91, г. Казань, 420110; fin5zhannik@rambler.ru

Статья получена: 01.02.2017 **Статья принята в печать:** 18.02.2017

DETECTING OCCULT HEPATITIS B WHEN TESTING DONATED BLOOD

Eremeeva ZhG[1] ✉, Fazylov VH[2]

[1] Republican Clinical Dermatovenerologic Dispensary, Kazan, Russia

[2] Department of Infectius Diseases, Medico-Prophylactic Faculty, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Individuals carrying occult (latent) hepatitis B pose epidemiological threat. Testing donated blood donors for surface antigen HBsAg (hepatitis B virus, HBV) only does not allow to assume the blood safe from the point of view of infections, which can result in post-transfusion transmission of infection. Lack of confidence here is due to the fact that the virus is present in the body even when HBsAg is negative. The study analyzes data of 61,155 blood donors of the Republican Blood Center (Kazan), collected in 2010–2014. The tests applied were those aimed at detecting HBsAg, anti-HBc-total, anti-HBc IgM (enzyme immunoassay), and determining DNA of the virus in the blood by polymerase chain reaction in "real time". It was found that donors with occult hepatitis B are identified each year, but their numbers decrease gradually. To prevent the spread of the virus it is recommended to add the anti-HBc-total test to the standard set of diagnostic tests.

Keywords: occult hepatitis B, latent hepatitis B, HBV infection, donor, blood, enzyme immunoassay, PCR diagnostics, HBsAg, anti-HBc-total, anti-HBc IgM

Acknowledgements: authors thank Ramil Turaev from the Republican Blood Center (Kazan, Russia) for the opportunity to work with donor cards and Center's reports.

✉ **Correspondence should be addressed:** Zhanna Eremeeva
prospekt Pobedy, d. 39, kv. 91, Kazan, Russia, 420110; fin5zhannik@rambler.ru

Received: 01.02.2017 **Accepted:** 18.02.2017

Инфекционная безопасность донорской крови определяет предупреждение передачи гемоконтактных инфекций от донора реципиенту. Скрининговая диагностика вирусного гепатита В (hepatitis B virus, HBV) привела к значительному снижению заболеваемости этой инфекцией [1]. Однако, несмотря на доступность чувствительных тест-систем для обнаружения поверхностного антигена HBV (HBsAg), по-прежнему имеют место случаи посттрансфузионного гепатита В [2, 3]. Это связано с тем, что вирус может длительное время находиться в латентном состоянии в ткани печени, а в некоторых случаях — и в крови HBsAg-отрицательных пациентов [4, 5]. Поэтому оккультный (латентный) гепатит В представляет опасность при донорстве крови и трансплантации органов [6]. Описаны случаи обнаружения ДНК HBV у реципиентов, получавших HBs-негативную кровь от доноров, имевших скрытую HBV-инфекцию. Таким образом, латентный гепатит В представляет реальную угрозу распространения вируса в популяции и его активации в организме человека в условиях иммуносупрессии [5].

Целью нашего исследования явилась диагностика скрытой формы HBV-инфекции, выявленной при тестировании донорской крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование провели на базе Республиканского центра крови (РЦК) в г. Казани. Были проанализированы данные 61 155 донора, полученные в 2010–2014 гг.: результаты тестирования на HBsAg, антитела к ядерному антигену суммарные (anti-HBc-total), иммуноглобулины класса М к ядерному антигену (anti-HBc IgM), ДНК HBV.

Определение HBsAg, anti-HBc-total и anti-HBc IgM проводили методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих реагентов фирмы «Вектор-Бест» (Россия) с чувствительностью 0,01 МЕ/мл. ДНК HBV выявляли методом полимеразной цепной реакции в «реальном времени» на приборе COBAS S 201 (Roshe, Швейцария) с использованием набора реагентов Cobas TaqScreen MPX Test, v2.0 и CobasTaqScreen MPX ControlKit, v.2.0 (Roche).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

HBsAg — скрининговый маркер HBV-инфекции. Регистрация данного маркера при тестировании донорской крови подтверждает наличие активных источников инфекции. Лиц, в крови которых обнаруживают HBsAg, отводят от донорства, в отношении них проводят необходимые противоэпидемические мероприятия. В казанском РЦК в 2010–2014 гг. было зафиксировано от 6 до 25 случаев выявления маркера в год (рис. 1), при этом отмечена тенденция к снижению числа таких случаев.

Положительные результаты на anti-HBc-total регистрировали ежегодно в 3,5–6,9 % случаев, т е. кровь от 400 до 900 доноров не могла быть использована в дальнейшем (рис. 2). При выявлении этого маркера проводится также дополнительная диагностика на anti-HBc IgM. В 2010–2014 гг. иммуноглобулины класса М обнаруживались в 2,5–9, 9 % образцов крови доноров с признаками присутствия в организме HBV-нфекции в латентной форме (образцов с положительным результатом по anti-HBc-total) (рис. 3). Anti-HBc IgM — маркер активности вируса в организме, который указывает на необходимость детального обследования человека.

ДНК HBV в сыворотке крови — основной показатель репликации вируса. Примерно в 20 % случаев обнаружение латентной HBV-инфекции в сыворотке крови возможно только с помощью ДНК-диагностики [7]. В РЦК ПЦР в «реальном времени» проводится для подтверждения отсутсвия инфекции у доноров с отрицательными результатами по классическим маркерам. Такое дополнительное исследование крови также позволяет выявлять активные формы HBV-инфекции среди случаев латентного гепатита В (рис. 4).

Рис. 1. Статистика положительных результатов скрининг-теста (HBsAg) за 2010–2014 гг.

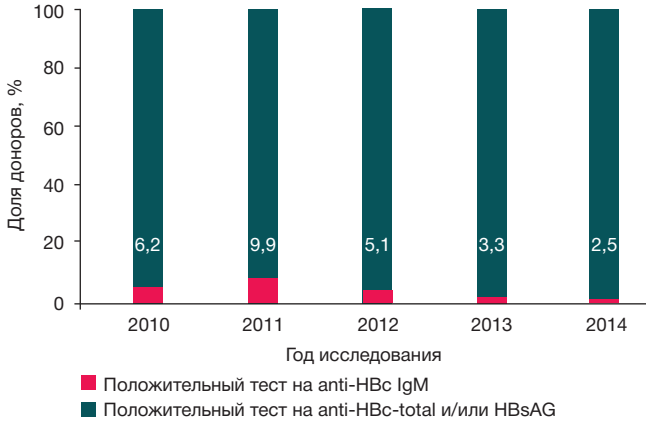


Рис. 2. Статистика по числу случаев обнаружения в крови доноров anti-HBc-total за 2010–2014 гг.

Рис. 3. Доля доноров, в крови которых обнаружены иммуноглобулины класса М, в группе доноров с положительными результатами на anti-HBc-total и/или HBsAg в 2010–2014 гг.

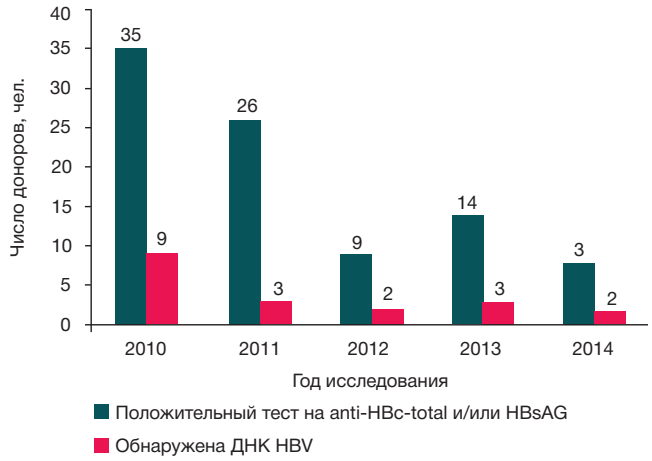


Рис. 4. Число случаев обнаружения ДНК вируса гепатита В в крови доноров с положительными результатами тестов на HBsAg и/или anti-HBc-total в 2010–2014 гг.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В России далеко не во всех лечебно-профилактических учреждениях исследуют кровь доноров на наличие антител к вирусу гепатита В (с помощью маркеров anti-HBc-total или anti-HBc IgM), что затрудняет своевременное выявление латентной формы HBV-инфекции. Полученные нами данные позволяют заключить, что отсутствие в крови HBsAg не является гарантией инфекционной безопасности донорской крови, поскольку положительный результат на anti-HBc-total указывает на наличие контакта с вирусом в прошлом, а на anti-HBc IgM — на активную инфекцию. В HBsAg-негативной фазе ДНК вируса может присутствовать в организме на низком уровне: с определением в печени и редко — в сыворотке крови [8]. Поэтому эта фаза не означает полного выздоровления, т. к. в любой момент может наступить рецидив заболевания — стадия реактивации [9, 10]. У пациентов с латентной HBV-инфекцией было выявлено сохранение эффективного иммунологического ответа (анти-HBc total), что может привести к реактивации HBV с повторным появлением HBsAg [11].

Трудность выявления оккультного гепатита В объясняется отсутствием обязательного исследования крови на маркеры латентной HBV-инфекции и дальнейшего обследования донора. В эпидемиологическую службу поступают сведения о донорах с положительным результатом только по одному маркеру — HBsAg. Для своевременной реализации профилактических и противоэпидемических мероприятий необходимо дополнительно обследовать и наблюдать диспансерно лиц, в крови которых обнаружены anti-HBc-total и anti-HBc IgM. В противном случае использование крови доноров с оккультным гепатитом В увеличивает риск инфицирования при гемотрансфузиях и способствует циркуляции вируса в популяции [12, 13].

ВЫВОДЫ

Ежегодно среди доноров выявляются лица с положительными результатами тестирования на маркеры HBV-инфекции (HBsAg, anti-HBc-total, anti-HBc IgM, ДНК HBV). Введение в стандарт диагностики вирусного гепатита В в центрах крови определения anti-HBc-total позволит повысить выявляемость латентной HBV-инфекции [14, 15]. Организация преемственности работы специалистов центров крови и других лечебно-профилактических учреждений обеспечит раннее выявление активных форм инфекции и предупреждение хронизации процесса, а также поможет предотвратить заражение других лиц.

Литература

1. Enticott JC, Kandane-Rathnayake RK. Prevalence versus incidence. Transfusion. 2012 Sep; 52 (9): 1868–70. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03687.x.
2. Saraswat S, Banerjee K, Chaudhury N, Mahant T, Khandekar P, Gupta RK, et al. Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood. J Hepatol. 1996 Nov; 25 (5): 639–43.
3. Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. Transfusion. 2007 Jul; 47 (7): 1197–205.
4. Ивашкин В. Т., Морозова М. А., Маевская М. В., Соколина И. А, Герман Е. Н. Бундина М. В. Факторы риска развития гепатоцеллюлярной карциномы. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2009; (1): 4–15.
5. Алешкин В. А., Зубкин М. Л., Селькова Е. П., Червинко В. И., Суслов А. П., Овчинников Ю. В. и др. Эпидемиологическое и клиническое значение «оккультной» HBV-инфекции. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2015; (4): 55–64.
6. Фазылов В. Х. Этиологические и патогенетические аспекты диагностики и лечения вирусных гепатитов. Казанский медицинский журнал. 2013; (6): 785–92.
7. Hollinger FB. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. Transfusion. 2008 May; 48 (5): 1001–26. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01701.x.
8. Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fisicaro P, Penna A, Di Vincenzo P, et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. Gastroenterology 2008 May;134 (5): 1470–81.
9. World Gastroenterology Organisation. WGO Global Guideline — Hepatitis B. Version 2.0. 2015 Feb. Available from: http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/hepatitis-b-english-2015.pdf.
10. Нечаев В. В. Мукомолов С. Л., Назаров В. Ю., Пожидаева Л. Н., Чахарьян В. В. Хронические вирусные гепатиты: прошлое, настоящее, будущее. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013; (3): 4–10.
11. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2008 Oct; 49 (4): 652–7. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.07.014.
12. Еналеева Д. Ш. Современные аспекты естественного течения хронического вирусного гепатита В. Казанский медицинский журнал. 2012; 93 (2): 161–6.
13. Еналеева Д. Ш., Фазылов В. Х., Созинов А. С. Хронические вирусные гепатиты В, С и D. М.: МЕДпресс-информ; 2011. 464 с.
14. Морозов И. А., Ильченко Л. Ю., Федоров И. Г., Гордейчук И. В., Гордейчук И. Н., Княженцева А. К. и др. Скрытый гепатит В: клиническое значение и проблемы диагностики. Архив внутренней медицины. 2012; (4): 39–45.
15. Гордейчук И. В., Малинникова Е. Ю., Попова О. Е. Латентный гепатит В у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Мир вирусных гепатитов. 2008; (6): 3–7.

References

1. Enticott JC, Kandane-Rathnayake RK. Prevalence versus incidence. Transfusion. 2012 Sep; 52 (9): 1868–70. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03687.x.
2. Saraswat S, Banerjee K, Chaudhury N, Mahant T, Khandekar P, Gupta RK, et al. Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood. J Hepatol. 1996 Nov; 25 (5): 639–43.
3. Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. Transfusion. 2007 Jul; 47 (7): 1197–205.4.
4. Ivashkin VT, Morozova MA, Maevskaya MV, Sokolina IA, German YeN, Bundina MV. [Risk factors of development of hepatocellular carcinoma]. The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology. 2009; (1): 4–15. Russian.
5. Aleshkin VA, Zubkin ML, Selkova EP, Chervinko VI, Suslov AP, Ovchinnikov YuV, et al. [Epidemiological and clinical significance of "occult" HBV-infection]. Epidemiology and Infectious Diseases. Topical issues. 2015; (4): 55–64. Russian.
6. Fazylov VH. [Etiological and pathogenetic aspects of diagnosis and treatment, of viral hepatitis]. Kazan Medical Journal. 2013; (6): 785–92.
7. Hollinger FB. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. Transfusion. 2008 May; 48 (5): 1001–26. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01701.x.
8. Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fisicaro P, Penna A, Di Vincenzo P, et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. Gastroenterology 2008 May;134 (5): 1470–81.
9. World Gastroenterology Organisation. WGO Global Guideline — Hepatitis B. Version 2.0. 2015 Feb. Available from: http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/hepatitis-b-english-2015.pdf.
10. Nechaev VV, Mukomolov SL, Nazarov VYu, Pozhidaeva LN, Chakhar`yan VV. [Chronic viral hepatitis: past, present and future]. Epidemiology and Infectious Diseases. 2013; (3): 4–10. Russian.
11. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2008 Oct; 49 (4): 652–7. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.07.014.
12. Enaleeva DSh. [Modern aspects of the natural history of chronic hepatitis B-virus wi-B]. Kazan Medical Journal. 2012; 93 (2): 161–6. Russian.
13. Enaleeva DSh, Fazylov VH, Sozinov AS. Khronicheskie virusnye gepatity B, C i D. Moscow: MED-press-infrom; 2011. 464 p. Russian.
14. Morozov IA, Ilchenko LYu, Fedorov IG, Gordeychuk IV, Gordeychuk IN, Knyazhentseva AK, et al [Hidden Hepatitis B: Clinical significance and problems of diagnostics]. Archive of Internal Medicine. 2012; (4): 39–45. Russian.
15. Gordeychuk IV, Malinnikova EYu, Popova OE. [The latent hepatitis B in patients with HIV infection]. World of Viral Hepatitis. 2008; (6): 3–7. Russian.

ЛЕЧЕНИЕ РАН ЭКСТРАКТОМ ЛИСТЬЕВ ТРАНСГЕННОГО КАЛАНХОЭ С ЦЕКРОПИНОМ Р1 (ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А. С. Белоус[1,2] ✉, А. Б. Шевелев[1], Е. В. Трубникова[1], Ю. К. Бирюкова[1], Е. С. Мишина[2], Е. А. Лойко[2], А. А. Лебедева[3], Н. С. Захарченко[3]

[1] Научно-исследовательская лаборатория «Генетика», Курский государственный университет, Курск

[2] Курский государственный медицинский университет, Курск

[3] Пущинский филиал, Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Пущино

Проблема лечения гнойных ран актуальна в хирургии в связи с распространенностью ран различной этиологии, частотой гнойных осложнений, высокой летальностью, появлением антибиотикорезистентных штаммов бактерий. В работе исследована эффективность фармакотерапии раневого процесса экстрактом листьев трансгенного каланхоэ перистого с антимикробным пептидом цекропином Р1. Гнойную рану моделировали на крысах линии Wistar с внесением в рану культуры *Staphylococcus aureus*. Сформировали 4 группы по 10 животных в каждой. Во всех группах раны обрабатывали ежедневно однократно 3 % раствором перекиси водорода и дополнительным препаратом, кроме группы 1 (контрольной). В группе 2 использовали 10 % раствор цефазолина, в группе 3 — сок каланхоэ, в группе 4 — сок каланхоэ с цекропином Р1. Гистологическое исследование раневых биоптатов производили на 3, 10 и 14 сутки с начала лечения после выведения крыс из эксперимента путем передозировки наркоза. Результаты лечения через 3 сут были схожими во всех группах. Через 10 сут для ран крыс контрольной группы была отмечена незавершенность фазы экссудации, группы 2 — переход фазы экссудации в фазу регенерации, а групп 3 и 4 — покрытие грануляционной тканью. Несмотря на восстановление эпидермиса по краям ран в группах 2 и 3, кое-где сохранялся струп, а грануляционная ткань была менее зрелой, чем в группе 4. Результаты позволяют рекомендовать экстракт листьев трансгенного каланхоэ перистого с цекропином Р1 для широкого клинического изучения.

Ключевые слова: раневой процесс, гнойная рана, *Staphylococcus aureus*, каланхоэ перистое, *Kalanchoe pinnata*, цекропин Р1, антимикробная терапия

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0016 от 5 июня 2014 г., шифр RFMEFI60714X0016).

Благодарности: Виктору Лазаренко из Курского государственного медицинского университета и Александру Худину из Курского государственного университета за возможность выполнения экспериментальной части исследования на базе научно-исследовательских лабораторий университетов.

✉ **Для корреспонденции:** Белоус Александр Сергеевич
пр-т А. Дериглазова, д. 71, кв. 89, г. Курск, 305014; a.s.belous@mail.ru

Статья получена: 05.02.2017 **Статья принята к печати:** 18.02.2017

WOUND CARE WITH THE LEAF EXTRACT OF CECROPIN P1-PRODUCING TRANSGENIC KALANCHOE: HISTOLOGICAL FINDINGS

Belous AS[1,2]✉, Shevelev AB[1], Trubnikova EV[1], Biryukova YuK[1], Mishina ES[2], Loyko EA[2], Lebedeva AA[3], Zakharchenko NS[3]

[1] Research Laboratory “Genetics”, Kursk State University, Kursk, Russia

[2] Kursk State Medical University, Kursk, Russia

[3] Puschino branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Puschino, Russia

Management of purulent wounds is a problem that requires particular attention: wounds are a common injury type for which suppurative complications are frequent, mortality rates are high and antimicrobial therapy may be ineffective due to the presence of drug-resistant bacteria in the wound. In this work we have studied the effectiveness of wound treatment with the leaf extract of transgenic *Kalanchoe pinnata* modified to produce antimicrobial peptide cecropin P1. Purulent wounds infected with *Staphylococcus aureus* were modeled in Wistar rats. Four groups of animals were formed, with 10 animals in each group. In all groups, the wounds were cleansed with 3 % hydrogen peroxide solution once a day; all groups except the controls received additional treatment. Group 2 received 10 % cefazolin solution, group 3 received kalanchoe juice, group 4 received the juice of cecropin P1-producing kalanchoe. Histologic stains of biopsy samples were performed after rats were sacrificed by anesthetic overdose on days 3, 10 and 14 after treatment onset. On day 3, wound dynamics was the same in all groups. On day 10 exudate was still observed in the controls; in group two exudation was almost finished and regeneration was about to begin; in groups 3 and 4 the wound defect was filled with granulation tissue. In spite of epidermal repair along the wound edges in groups 2 and 3, there still was some sloughing and granulation tissue was less mature than in group 4. We recommend conducting more extensive clinical research of the leaf extract of cecropin P1-containing transgenic *Kalanchoe pinnata*.

Keywords: wound healing, purulent wound, *Staphylococcus aureus*, *Kalanchoe pinnata*, cecropin P1, antimicrobial treatment

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant No. 14.607.21.0016 dated June 5, 2014, ID RFMEFI60714X0016).

Acknowledgements: we thank Viktor Lazarenko of Kursk State Medical University and Alexandr Khudin of Kursk State University for providing full access to the research facilities of both universities.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandr Belous
prospect A. Deriglazova, d. 71, kv. 89, Kursk, Russia, 305014; a.s.belous@mail.ru

Received: 05.02.2017 **Accepted:** 18.02.2017

Актуальной проблемой современной хирургии является лечение гнойных ран, что связано с распространенностью ран различной этиологии, частыми гнойными осложнениями, высокой летальностью, значительными затратами на лечение [1, 2]. По данным некоторых авторов, в структуре хирургических заболеваний гнойные осложнения составляют 30–35 %, а смертность от них достигает 25 % [3–5].

Существует много методов лечения гнойных ран [6–10], в том числе разрабатываются и внедряются новые методы: гипербарическая оксигенация, лазерная терапия, магнитотерапия, управляемая абактериальная среда и др. [11–15]. Однако основным является метод лечения ран под повязкой — благодаря его доступности, простоте и экономичности [16–18].

Следует отметить, что массовое и бесконтрольное применение антибактериальных препаратов приводит к появлению микрофлоры, малочувствительной или нечувствительной к ним. Этот факт имеет особое значение при сложных хронических заболеваниях, например при лечении трофических язв у больных сахарным диабетом, где длительная антибактериальная терапия является обязательной [19, 20]. В таких случаях перспективно применение антимикробных пептидов, которые считаются альтернативой традиционным антибиотикам, а также использование биостимуляторов с ранозаживляющей активностью, к которым относится каланхоэ.

Многие растения рода *Kalanchoe* являются лекарственными: их сок используется для лечения ожогов, кожных ран, язв; они применяются как биостимуляторы при пересадке кожи. В соке каланхоэ содержатся флавоноиды, включая буфадиенолы, лектины, обладающие митогенной активностью в отношении лимфоцитов, витамины, органические кислоты, полисахариды, антиоксиданты и микроэлементы [21, 22]. В настоящее время получены трансгенные растения — биореакторы для получения фармацевтических субстанций — на основе видов *K. daigremontiana* [23, 24], *K. laciniata* [25] и *K. blossfeldiana* [26]. Наиболее ценным для фармакологии считается каланхоэ перистое (*K. pinnata*). В 2012 г. был разработан метод генетической трансформации каланхоэ перистого, в результате которой в растении экспрессируется ген цекропина P1 [27].

Цекропин P1 — секреторный фактор свиной нематоды *Ascaris suum*; относится к группе линейных α-спиральных пептидов, не содержащих цистеина [28]. В отличие от цекропинов насекомых он состоит из одной длинной положительно заряженной α-спирали, имеющей в своем составе практически все аминокислотные остатки. В экспериментах *in vitro* цекропин P1 высокоактивен против патогенных грамотрицательных и грамположительных бактерий [29], грибов [30] и некоторых опухолевых клеток [31], однако сведения о его антимикробной активности *in vivo* в литературе до настоящего времени не приводились.

В связи с вышеизложенным целью нашей работы являлась оценка эффективности фармакотерапии экстрактом листьев каланхоэ перистого с цекропином P1 раневого процесса на модели гнойной раны у крыс с дополнительным внесением в рану культуры *Staphylococcus aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar в возрасте 4 мес и массой 200–220 г, прошедших карантинирование в условиях вивария НИИ экологической медицины Курского государственного медицинского университета. Для исследования были взяты здоровые животные. Их содержали в стандартной экспериментальной биологически чистой комнате с температурой воздуха 22–24 °C и при цикличном освещении (по 12 ч света и темноты). Все крысы получали гранулированный корм и фильтрованную водопроводную воду. Манипуляции проводили в одно и то же время во второй половине дня. Наркотизацию животных осуществляли внутрибрюшинным введением водного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг веса, выведение из эксперимента — его передозировкой. В исследовании соблюдали принципы, изложенные в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986 г.).

Животных распределили по группам путем стратифицированной рандомизации со стратификацией по массе тела, а также проводимым операциям и манипуляциям. Из животных с моделированной гнойной раной (с дополнительным внесением в нее культуры *S. aureus*) были сформированы следующие группы:

группа 1 (контрольная): животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода (n = 10);

группа 2: животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода с последующей обработкой 10 % раствором цефазолина (n = 10);

группа 3: животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода с последующей обработкой соком каланхоэ (n = 10);

группа 4: животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода с последующей обработкой соком каланхоэ с цекропином P1 (n = 10).

Животным моделировали гнойную рану под наркозом в стерильных условиях. Для этого на выбритом от шерсти участке спины площадью 20 × 20 мм, обработанном антисептиком, иссекали кожу с подкожной клетчаткой. В полученную рану вводили 1 мл раствора, содержащий 1 млрд микробных тел суточной культуры *S. aureus* 592. Для стандартизации условий лечения, предупреждения деформации раны, высыхания, загрязнения раневой поверхности и укусов другими животными над раной подшивали к коже марлевую повязку. Через 48 ч у всех животных формировалось нагноение раны со всеми характерными признаками воспаления. После снятия швов марлевую повязку удаляли, эвакуировали гной из раны и производили ее обработку один раз в день ежедневно в течение 14 суток.

Гистологическое изучение раневых биоптатов производили на 3, 10 и 14 сутки от начала лечения после выведения подопытного животного из эксперимента путем передозировки наркоза (по 3 животных на каждое выведение). Забор материала осуществляли, иссекая участок мягких тканей дна и прилежащего края раны лезвием. Взятый материал сразу фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина с последующей проводкой по восходящим спиртам и заливкой в парафин по стандартной методике. Приготовленные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Микроскопирование и микрофотосъёмку проводили с помощью оптической системы, состоявшей из микроскопа Leica CM E (Leica Microsystems, Германия) и окуляр-камеры «Микромед DCM-510 SCOPE» («Наблюдательные приборы», Россия) на увеличениях ×40, ×100, ×200 и ×400 крат с документированием снимков в программе Future Win Joe (Future Optics, Китай), входящей в комплект поставки окуляр-камеры. При оценке гистологических срезов обращали внимание на выраженность воспалительных реакций, сроки появления грануляционной ткани,

возникновение краевой эпителизации, а также структурную полноценность вновь образованного эпителия. Также исследовали клеточный состав ткани, непосредственно прилегающей к краям раны, а на поздних сроках — новообразованной ткани. По кариологическим признакам дифференцировали клетки волокнистой соединительной ткани. Процентное соотношение клеток различных типов рассчитывали после подсчета 100 клеток в нескольких не пересекающихся полях зрения (не менее 10).

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel 10.0. Рассчитывали среднее значение (M) и ошибку среднего (m) для всех показателей. Использовали двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями для сравнения значений показателей по группам животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты лечения в группе 1 (контроль)

3 сутки

Гнойные раны характеризовалась признаками острого гнойного воспаления. Поверхность ран была покрыта тканевым детритом, с фибринно-лейкоцитарными массами, под которыми определялись скопления лейкоцитов в состоянии распада и геморрагические участки. Ткани околораневой зоны были отечными, с выраженными признаками лейкоцитарной инфильтрации. Отек и инфильтрация проникали глубоко, до мышечной ткани. Эпителий по краям ран был утолщен, дезорганизован. Коллагеновые волокна в пределах дермы были набухшими, сосуды дермы — полнокровными и расширенными (рис. 1, А).

10 сутки

Дефект тканей был заполнен гнойно-некротическими массами, эпидермис по краям ран утолщен. На уровне дермы определялась выраженная лейкоцитарная инфильтрация, встречались макрофаги и тучные клетки (таблица), интерстициальный отек распространился в глубокие слои дермы, до мышечных волокон (рис. 1, Б).

14 сутки

В ранах сохранялась глубокая лейкоцитарная инфильтрация, некротические массы заполняли дефект тканей. По краям ран определялась отечная дерма с истонченным слоем эпидермиса. В подлежащей мышечной ткани сохранялся воспалительный отек и инфильтрация. На уровне дна ран начинала формироваться грануляционная ткань, в которой встречались микроабсцессы, заполненные лейкоцитами (рис. 1, В).

Результаты лечения в группе 2 (10 % раствор цефазолина)

3 сутки

В ранах гистологически определялись признаки острого гнойного воспаления. В зоне раневого дефекта отмечалось некротическое содержимое, воспалительная инфильтрация в пределах дермы была представлена не только лейкоцитами, но и единичными нейтрофилами. В поле зрения визуализировались многочисленные макрофаги (рис. 1, Г).

10 сутки

Наблюдали активный рост и организацию соединительной ткани в пределах дермы. Данные процессы протекали в присутствии клеток фибробластического ряда и макрофагов (таблица). Отмечалась выраженная пролиферация и дифференцировка клеток эпителия (рис. 1, Д).

14 сутки

Определялись участки сформированного эпидермиса с четкой дифференцировкой слоев, но толщина превышала уровень интактной кожи. На уровне дермы имелась зрелая грануляционная ткань. В глубоких слоях определялись единичные микроочаги воспалительной инфильтрации. Восстановительные процессы в условиях инфицирования характеризовались образованием значительного количества грануляционной ткани, которая замещалась фиброзной, и наличием на месте дефекта кожи большого количества разнонаправленно расположенных коллагеновых волокон (рис. 1, Е).

Результаты лечения в группе 3 (сок каланхоэ)

3 сутки

В этой группе морфологическая картина раневого процесса была схожей с таковой в контрольной группе и группе 2. Тучные клетки активно вовлекались в процесс заживления, о чем свидетельствовало повышение общего количества клеток в околораневой зоне. В зоне раневого дефекта сохранялись остатки гнойно-некротического содержимого (рис. 2, А).

10 сутки

Краевой эпидермис начинал перемещение от периферии к дну раны, где появлялись очаги грануляционной ткани. Тонкие единичные коллагеновые волокна были хаотично расположены в окружении клеточного компонента с преобладанием фибробластов и макрофагов (таблица, рис. 2, Б).

14 сутки

В некоторых случаях отмечалась полная эпителизация зоны дефекта. В пределах дермы имелась грануляционная ткань различной степени зрелости. Коллагеновые волокна были окружены фибробластами, имели расположение преимущественно параллельное поверхности кожных покровов (рис. 2, В).

Результаты лечения в группе 4 (сок каланхоэ с цекропином Р1)

3 сутки

Полости ран были заполнены некротическими массами. Ткани содержали большое количество нейтрофилов. На уровне дермы определялись выраженный отек и расширенные капилляры (рис. 2, Г).

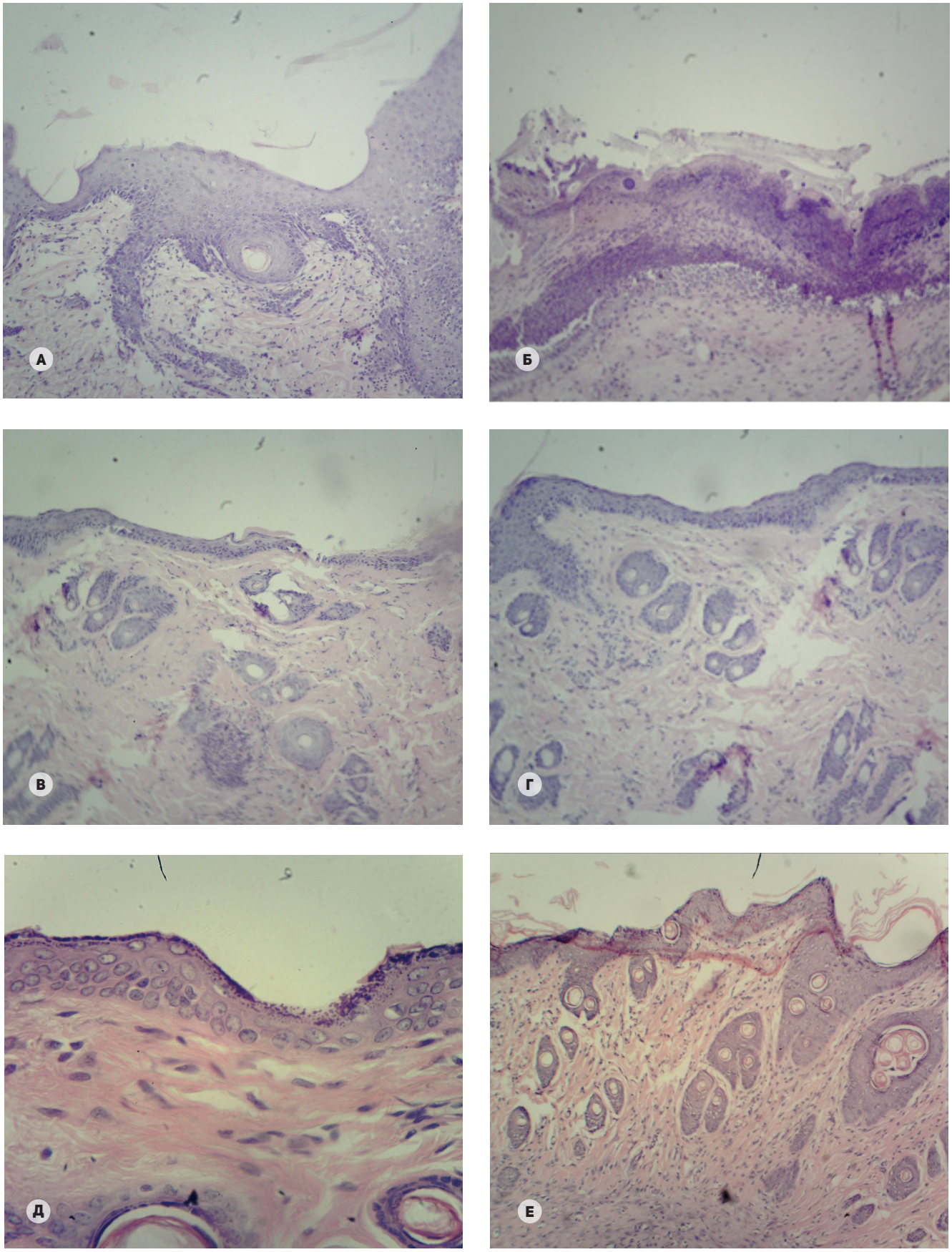


Рис. 1. Исследование раневых биоптатов крыс. **(А–В)** Гистологические срезы раневых биоптатов крыс контрольной группы (группы 1) на разных сроках выведения животных из эксперимента: **(А)** — через 3 сут, **(Б)** — через 10 сут, **(В)** — через 14 сут. **(Г–Е)** Гистологические срезы раневых биоптатов крыс группы 2 (дополнительная обработка раны 10 % раствором цефазолина) на разных сроках выведения животных из эксперимента: **(Г)** — через 3 сут, **(Д)** — через 10 сут, **(Е)** — через 14 сут. Окраска гематоксилином и эозином, ×280

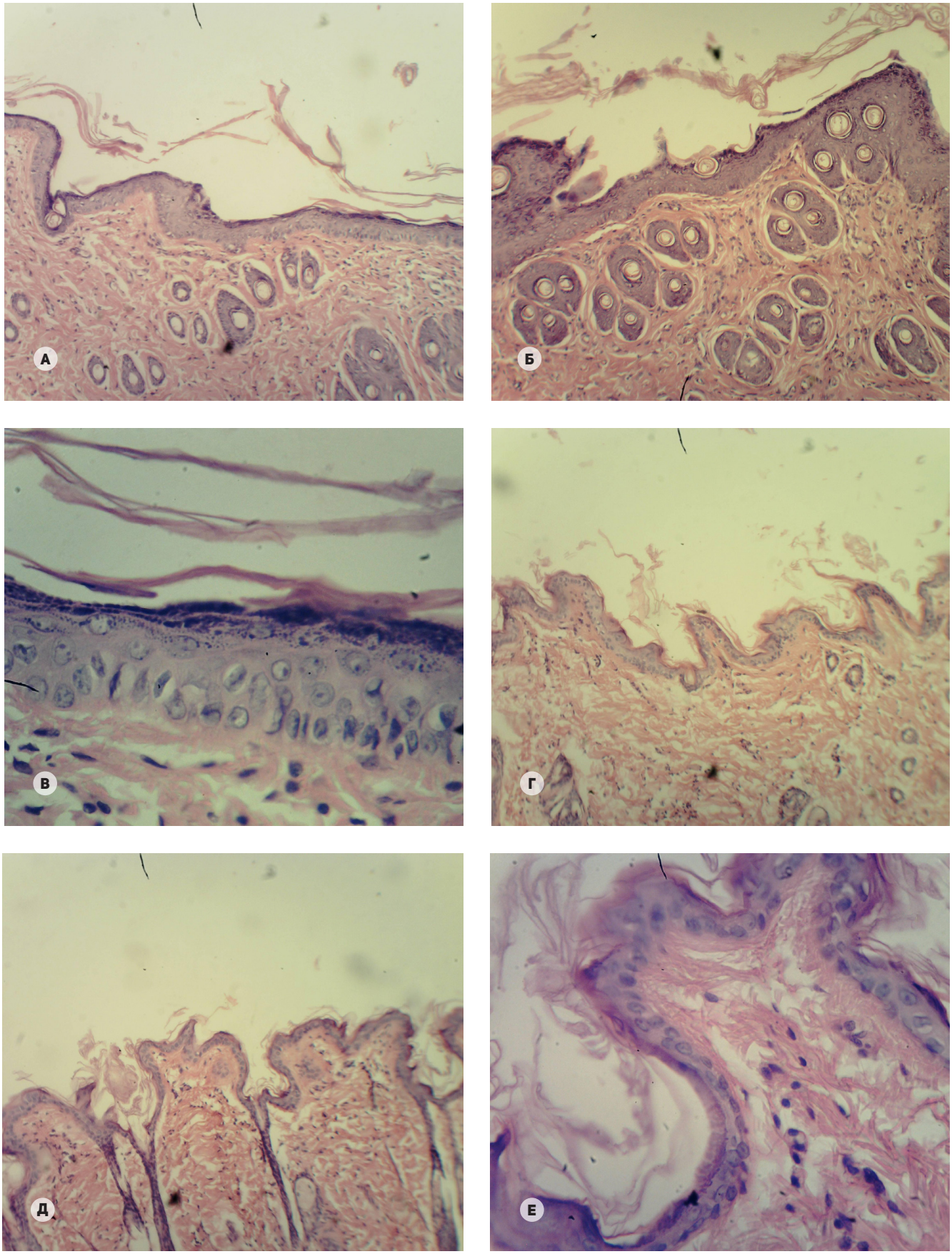


Рис. 2. Исследование раневых биоптатов крыс. **(А–В)** Гистологические срезы раневых биоптатов крыс группы 3 (дополнительная обработка раны соком каланхоэ) на разных сроках выведения животных из эксперимента: **(А)** — через 3 сут, **(Б)** — через 10 сут, **(В)** — через 14 сут. **(Г–Е)** Гистологические срезы раневых биоптатов крыс группы 4 (дополнительная обработка раны соком каланхоэ с антимикробным пептидом цекропином Р1) на разных сроках выведения животных из эксперимента: **(Г)** — через 3 сут, **(Д)** — через 10 сут, **(Е)** — через 14 сут. Окраска гематоксилином и эозином, ×280

10 сутки

Регенераторные процессы характеризовались локализацией воспалительной реакции, чему способствовало образование демаркационного вала из нейтрофилов. Для воспалительного инфильтрата был характерен четко выраженный клеточный полиморфизм. Грануляционная ткань покрывала дно раны. На фоне активного ангиогенеза улучшалась васкуляризация тканей в околораневой зоне, уменьшались отек и воспалительная инфильтрация (рис. 2, Д).

14 сутки

Раневой дефект был заполнен многочисленными коллагеновыми волокнами, окруженными фибробластами. На фоне хаотичного расположения волокнистого компонента отмечалось преобладание горизонтального направления волокон. Эпителий нарастал на грануляционную ткань. Толщина эпителия превышала уровень интактной кожи (рис. 2, Е).

Сравнение результатов лечения в группах

Гистологическое исследование на 3 сутки наблюдения не выявило существенных различий в результатах лечения по группам. Однако на 10 сутки для ран крыс контрольной группы была отмечена незавершенность фазы экссудации, группы 2 — переход фазы экссудации в фазу регенерации, а групп 3 и 4 — покрытие грануляционной тканью.

На 14 сутки в срезах раневых биоптатов крыс групп 3 и 4 количество фибробластов значительно превышало количество гранулоцитов и макрофагов (таблица), что свидетельствовало об активной регенерации. Следует также отметить, что наиболее эффективной регенерация была в группе 4 (дополнительная обработка ран соком каланхоэ с цекропином Р1), в которой все раны к концу опыта были полностью покрыты новым эпидермисом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение трасгенных растений *K. pinnata*, в которых экспрессируется ген цекропина Р1 с накоплением пептида в цитоплазме клеток, описано в ряде статей, начиная с 2007 г. [30]. Опубликованы сведения об уровне накопления цекропина Р1 и его действии на фитопатогены и стандартные бактериальные культуры *in vitro*. Тем не менее ни одна из этих работ не содержит данных о терапевтической эффективности сока трансгенных растений каланхоэ при лечении инфекций у животных. Между тем, наличие у *K. pinnata* собственной ранозаживляющей, иммуномодулирующей и ремоделирующей активности [32] позволяет ожидать усиления антимикробного эффекта цекропина Р1 при воздействии сока трасгенных растений на патогены *in vivo*.

Полученные нами результаты исследования свидетельствуют о том, что применение сока каланхоэ ускоряет переход от первой фазы воспалительного процесса к регенерации. По сравнению с контролем быстрее спадает отек, происходит очищение раны от некротических масс, раньше появляются грануляции и начинается эпителизация раны. Разнообразие клеточного состава и наличие клеток фибробластического ряда различных стадий зрелости говорит о стимулирующем воздействии изучаемых соединений на пролиферативную и функциональную активность клеток грануляционной ткани. Терапевтический эффект сока каланхоэ с цекропином Р1 наиболее выражен по отношению к контролю на поздних стадиях заживления раны. Результаты лечения ран дополнительной обработкой 10 % раствором цефазолина и соком каланхоэ были лучше, чем в контрольной группе, но хуже, чем при дополнительной обработке соком каланхоэ с цекропином Р1: несмотря на практически полное восстановление эпидермиса по краям ран в группах 2 и 3, на отдельных участках частично сохранялся струп, а количество различных клеточных элементов в грануляционной ткани указывало на меньшую степень ее зрелости при сравнении с грануляционной тканью в группе 4. Выявленное нами полное закрытие дефекта новообразованным эпидермисом в группе с использованием сока каланхоэ с цекропином Р1, а также появление производных кожи свидетельствуют не только об ускорении процессов регенерации, но и о полноценном восстановлении кожи за счет более активной миграции и пролиферации эндотелиоцитов и усиления ангиогенеза.

Следует отметить, что эффективность антимикробного действия сока трансгенного каланхоэ на стафилококк *in vivo* существенно превысила ту, которой можно было бы ожидать на основании известных данных об антимикробной активности этого препарата на батериальных культурах *in vitro* [30]. По-видимому, этот эффект обусловлен сочетанием антимикробного действия цекропина Р1 и эндогенных буфадиенолов сока *K. pinnata*. Кроме того, существенный вклад в ускоренную элиминацию патогенов из раны под действием сока трансгенных растений может вносить иммуностимулирующая активность гемагглютинирующих лектинов *K. pinnata* [33]. Подобно конканавалину А

Соотношение клеточных элементов в смоделированных ранах в зависимости от типа лечения и срока выведения животных из эксперимента

Группа животных	Срок выведения животных из эксперимента, сут											
	3				10				14			
	Фибробласты	Макрофаги	Гранулоциты	Лимфоциты	Фибробласты	Макрофаги	Гранулоциты	Лимфоциты	Фибробласты	Макрофаги	Гранулоциты	Лимфоциты
1 (контроль)	14,7 ± 0,7	12,9± 0,3	49,9 ± 1,8	22,5 ± 0,6	17,0 ± 0,4	13,3 ± 0,2	48,0 ± 2,8	21,7 ± 0,3	24,9 ± 0,5	38,7 ± 1,7	15,6 ± 0,8	20,8 ± 0,3
2 (10 % раствор цефазолина)	9,5 ± 0,2	59,3 ± 2,1	7,9 ± 0,2	23,3 ± 0,2	15,2 ± 0,1	62,4 ± 1,3	7,5 ± 0,4	14,9 ± 0,6	31,9 ± 0,7	51,7 ± 2,6	8,4 ± 0,1	8,0 ± 0,1
3 (сок каланхоэ)	12,9 ± 0,6	37,1 ± 0,7	30,3 ± 1,6	19,7 ± 0,4	17,7 ± 0,2	38,9 ± 1,6	15,6 ± 0,2	27,8 ± 0,4	24,0 ± 0,6	47,3 ± 2,5	14,4 ± 0,2	14,3 ± 0,2
4 (сок каланхоэ + цекропин Р1)	12,1 ± 0,2	21,4 ± 0,4	44,0 ± 1,2	22,5 ± 0,1	20,5 ± 1,0	23,9 ± 0,4	24,2 ± 1,1	31,4 ± 2,6	30,1 ± 1,2	26,4 ± 1,6	18,4 ± 1,1	25,1 ± 1,2

или фитогемагглютинину, эти лектины способны ускорять размножение лимфоцитов, в том числе специфичных к антигенам патогенов, которые скапливаются вблизи очага инфекции. Этот эффект на фоне подавления физиологических функций бактерий цекропином Р1 и антимикробными факторами сока может приводить к существенному ускорению и усилению выработки антител. Наконец, ускорять элиминации патогенов из раны могут более выраженная васкуляризация и ремоделирование рубцовой ткани под действием неидентифицированных компонентов сока каланхоэ. Эти эффекты способны ускорить транспорт клеток и растворимых факторов иммуной системы к очагу инфекции, усиливая защитные реакции.

ВЫВОДЫ

В исследовании показана высокая эффективность фармакотерапии соком трансгенного каланхоэ перистого (с цекропином Р1) раневого процесса на модели гнойной раны у крыс с дополнительным внесением в рану культуры *S. aureus*. Полученные данные позволяют рекомендовать субстанцию для широкого клинического изучения. Сок трасгенного каланхоэ наиболее перспективен в качестве средства для лечения трофических язв у пациентов с сахарным диабетом. Для этого типа наружных поражений характерна сочетанная инфекция рядом патогенов на фоне сниженного иммунитета, при этом длительное применение антибиотиков ограничено выработкой устойчивости бактерий к ним.

Использование для лечения наружных микробных инфекций цельного сока трансгенного *K. pinnata* вместо очищенного из него атимикробного пептида позволит не только снизить затраты на очистку лекарственной субстанции, но и усилить лечебное действие цекропина Р1. Таким образом, *K. pinnata* может рассматриваться как перспективный экономически эффективный и технологически доступный биореактор для получения линейки субстанций антимикробного назначения петидной и особенно белковой природы, в том числе альфа-литической протеазы, лизостафина или гирудина.

Литература

1. Блатун Л. А. Местное медикаментозное лечение ран. Проблемы и новые возможности их решения. Consilium Medicum. Хирургия. (Прил.). 2007; (1): 9–15.
2. Heal C, Buettner P, Browning S. Risk factors for wound infection after minor surgery in general practice. Med J Aust. 2006 Sep 4; 185 (5): 255–8.
3. Абаев Ю. К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. Ростов н/Д: Феникс; 2006. 427 с.
4. Фролов А. П., Миронов В. И., Гилёва И. И. Лечение гнойно-некротических заболеваний мягких тканей в условиях хирургического стационара. В сб.: Петрова М. М., редактор. Актуальные вопросы современной хирургии: Материалы научно-практической конференции; 10–12 марта 2008 г.; Москва, Россия. М.; Красноярск: Изд-во КрасГМА; 2008. с. 457–9.
5. Belda FJ, Aguilera L, García de la Asunción J, Alberti J, Vicente R, Ferrándiz L, et al. Supplemental perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial. JAMA. 2005 Oct 26; 294 (16): 2035–42.
6. Мошуров И. П., Банин И. Н., Минаков О. Е., Черных М. А. Анализ эффективности местного лечения гнойно-воспалительной патологии при использовании импульсного потока лечебного раствора. Системн. анализ и управ. в биомед. системах. 2008: 7 (1): 106–10.
7. Антонюк А. В. Вакуум-терапия в комплексном лечении хронических ран [автореф. диссертации]. Ярославль: Ярославская государственная медицинская академия; 2007. 22 с.
8. Гаджиев Э. А. Низкоинтенсивная лазерная и импульсная индукционная магнитотерапия в лечении гнойных ран [автореф. диссертации]. М.: Государственный научный центр лазерной медицины; 2007. 29 с.
9. Гурвич Б. Л. Применение региональной дистанционной ультразвуковой санации в комплексе лечения больных с гнойными ранами (клинико-экспериментальное исследование) [автореф. диссертации]. Воронеж: Воронежская государственная медицинская академия имени Н. Н. Бурденко; 2007. 21 с.
10. Исаев У. М. Лечение гнойных ран озономагнитофорезом (клиническое исследование) [автореф. диссертации]. Махачкала: Дагестанская государственная медицинская академия; 2008. 19 с.
11. Гайворонская Т. В. Экспериментальное обоснование эффективности применения непрямого электрохимического окисления крови и антиоксидантной терапии при лечении гнойных ран мягких тканей. Стоматология. 2008; 87 (1): 18–21.
12. Загиров У. З., Исаев У. М., Салихов М. А. Клинико-морфологическое обоснование озономагнитофореза в лечении гнойной раны. Хирургия. Журнал имени Н. И. Пирогова. 2008; (12): 24–6.
13. Загиров У. З., Исаев У. М., Салихов М. А. Озономагнитофорез в лечении гнойной раны. Вестн. нов. мед. технол. 2007; 14 (3): 207–8.
14. Винник Ю. С. Карапетян Г. Э., Якимов С. В., Сычев А. Г. Использование криогенной стимуляции в лечении хронических ран. Вестн. хир. 2008; 167 (1): 27–8.
15. Затолокин В. Д., Халилов М. А., Мошкин А. С., Юдина О. А. Опыт применения новой методики лечения гнойных ран в экспериментальных условиях. Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. 2010; (2): 160–2.
16. Кузнецов Н. А., Никитин В. Г. Щадящие хирургические вмешательства и интерактивные повязки в лечении инфицированных ран. Consilium Medicum. Хирургия. (Прил.). 2006; (2): 39–45.
17. Петрова В. В., Спесивцев Ю. А., Куликов Ю. Ф. Использование сорбирующих повязок типа «Ресорб» в лечении больных с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей при синдроме диабетической стопы в амбулаторных условиях. Амбулат. хир. Стационарозам. технол. 2004; 16 (4): 163–4.
18. Meylan G, Tschantz P. [Surgical wounds with or without dressings. Prospective comparative study]. Ann Chir. 2001 Jun; 126 (5): 459–62. French.
19. Жилина С. В., Миронов А. Ю., Поликарпова С. В., Пивкина Н. В. Стрептококки в этиологии гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей. Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». 2009; (2): 46–53.
20. Tillotson GS, Draghi DC, Sahm DF, Tomfohrde KM, Del Fabro T, Critchley IA. Susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from skin and wound infections in the United States 2005–07: laboratory-based surveillance study. J Antimicrob Chemother. 2008 Jul; 62 (1): 109–15.
21. Сажина Н. Н., Лапшин П. В., Загоскина Н. В., Короткова Е. И., Мисин В. М. Сравнительный анализ антиоксидантной активности соков каланхоэ. Хим. растит. сырья. 2013; (3): 113–9.
22. Akinsulire OR, Aibinu IE, Adenipekun T, Adelowotan T, Odugbemi T. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants Bryophyllum pinnatum and Kalanchoe crenata. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007 Feb 16; 4 (3): 338–44.
23. Garcês HM, Champagne CE, Townsley BT, Park S, Malhó R, Pedroso MC, et al. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus Kalanchoe. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 25; 104 (39): 15578–83.

24. Truesdale MR, Toldi O, Scott P. The effect of elevated concentrations of fructose 2,6-bisphosphate on carbon metabolism during deacidification in the crassulacean acid metabolism plant Kalanchoe daigremontiana. Plant Physiol. 1999 Nov; 121 (3): 957–64.
25. Григорьян А. Ю., Бежин А. И., Панкрушева Т. А., Иванов А. В., Жиляева Л. В., Кобзарева Е. В. и др. Иммобилизованные формы антисептиков для лечения гнойных ран в эксперименте. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2011; (4): 25–33.
26. Sanikhani M, Mibus H, Stummann BM, Serek M. Kalanchoe blossfeldiana plants expressing the Arabidopsis etr1-1 allele show reduced ethylene sensitivity. Plant Cell Rep. 2008 Apr; 27 (4): 729–37.
27. Захарченко Н. С., Лебедева А. А., Бурьянов Я. И., авторы; Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, патентообладатель. Способ получения генетически модифицированных растений каланхоэ, экспрессирующих ген цекропина Р1. Патент РФ RU 2445768. 27 марта 2012.
28. Martemyanov EA, Shirin AS, Grudkov AT. Synthesis cloning and expression of genes for antibacterial peptides: cecropin, magainin, and bombinin. Biotechnol Lett. 1996; 18 (12): 1357–62.
29. Pillai A, Ueno S, Zhang H, Lee JM, Kato Y. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode Ascaris suum. Biochem J. 2005 Aug 15; 390 (Pt 1): 207–14.
30. Захарченко Н. С., Рукавцова Е. Б., Гудков А. Т., Юхманова А. А., Школьная Л. А., Кадо К. И. и др. Эспрессия искусственного гена антимикробного пептида цекропина Р1 повышает устойчивость трансгенных растений картофеля к фитофторозу и белой гнили. Докл. АН. 2007; 415 (1): 129–31.
31. Shin SY, Kang JH, Jang SY, Kim Y, Kim KL, Hahm KS. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. Biochim Biophys Acta. 2000 Feb 15; 1463 (2): 209–18.
32. Куцик Р. В., Зузук Б. М. Каланхоэ перистое (Бриофиллюм чашечковый) Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. Аналитический обзор. Провизор [Интернет]. 2004 [дата обращения 27 февраля 2017]; (4–6). Доступно по: http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N4/art_27.php?part_code=68&art_code=4029; http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N5/art_33.php?part_code=68&art_code=4048; http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N6/art_28.php?part_code=68&art_code=4087
33. Adenike K, Eretan OB. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of Kalanchoe crenata (Andr.) Haw. J Biochem Mol Biol. 2004 Mar 31; 37 (2): 229–33.

References

1. Blatun LA. Mestnoe medikamentoznoe lechenie ran. Problemy i novye vozmozhnosti ikh resheniya. Consilium Medicum. Khirurgiya. (Suppl). 2007; (1): 9–15. Russian.
2. Heal C, Buettner P, Browning S. Risk factors for wound infection after minor surgery in general practice. Med J Aust. 2006 Sep 4; 185 (5): 255–8.
3. Abaev YuK. Spravochnik khirurga. Rany i ranevaya infektsiya. Rostov-on-Don: Feniks; 2006. 427 p. Russian.
4. Frolov AP, Mironov VI, Gileva II. Lechenie gnoino-nekroticheskikh zabolevanii myagkikh tkanei v usloviyakh khirurgicheskogo statsionara. In: Petrova MM, editor. Aktual'nye voprosy sovremennoi khirurgii: Proceedings of the Theoretical and Practical Conference; 2008 Mar 10–12; Moscow, Russia. Moscow; Krasnoyarsk: Prof. VF Voino-Yasenetsky KrasSMU Press; 2008. p. 457–9. Russian.
5. Belda FJ, Aguilera L, García de la Asunción J, Alberti J, Vicente R, Ferrándiz L, et al. Supplemental perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial. JAMA. 2005 Oct 26; 294 (16): 2035–42.
6. Moshurov IP, Banin IN, Minakov OE, Chernych MA. [Analisis of effectiveness an impuls stream of madical solution use in treatmant of inflamatory wounds]. Sistemnyi analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh. 2008: 7 (1): 106–10. Russian.
7. Antonyuk AV. Vakuum-terapiya v kompleksnom lechenii khronicheskikh ran [abstract of the dissertation]. Yaroslavl: Yaroslavl State Medical University; 2007. 22 p. Russian.
8. Gadzhiev EA. Nizkointensivnaya lazernaya i impul'snaya induktsionnaya magnitoterapiya v lechenii gnoinykh ran [abstract of the dissertation]. Moscow: Gosudarstvennyi nauchnyi tsentr lazernoi meditsiny; 2007. 29 p. Russian.
9. Gurvich BL. Primenenie regional'noi distantsionnoi ul'trazvukovoi sanatsii v komplekse lecheniya bol'nykh s gnoinymi ranami (kliniko-eksperimental'noe issledovanie) [abstract of the dissertation]. Voronezh: NN Burdenko Voronezh State Medical University; 2007. 21 p. Russian.
10. Isaev UM. Lechenie gnoinykh ran ozonomagnitoforezom (klinicheskoe issledovanie) [abstract of the dissertation]. Makhachkala: Dagestan State Medical University; 2008. 19 p. Russian.
11. Gaĭvoronskaia TV. [Experimental substantiation of indirect electrochemical blood oxidation and antioxidant therapy use efficacy in the treatment of festering soft tissues wounds]. Stomatologiia (Mosk). 2008; 87 (1): 18–21. Russian.
12. Zagirov UZ, Isaev UM, Salikhov MA. [Clinicopathologic basis of ozonomagnetophoresis in treatment of festering wounds]. Khirurgiia (Mosk). 2008; (12): 24–6. Russian.
13. Zagirov UZ, Isaev UM, Salikhov MA. Ozonomagnitoforez v lechenii gnoinoi rany. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii. 2007; 14 (3): 207–8. Russian.
14. Vinnik IuS, Karapetian GE, Iakimov SV, Sychev AG. [Application of cryogenic stimulation in treatment of chronic wounds]. Vestn Khir Im I I Grek. 2008; 167 (1): 27–8. Russian.
15. Zatolokin VD, Khalilov MA, Moshkin AS, Yudina OA. [Experience in the use of new methods of treatment of purulent wounds in the experimental conditions]. Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Estestvennye, tekhnicheskie i meditsinskie nauki. 2010; (2): 160–2. Russian.
16. Kuznetsov NA, Nikitin VG. Shchadyashchie khirurgicheskie vmeshatel'stva i interaktivnye povyazki v lechenii infitsirovannykh ran. Consilium Medicum. Khirurgiya. (Suppl). 2006; (2): 39–45. Russian.
17. Petrova VV, Spesivtsev YuA, Kulikov YuF. Ispol'zovanie sorbiruyushchikh povyazok tipa «Resorb» v lechenii bol'nykh s gnoino-nekroticheskimi porazheniyami nizhnikh konechnostei pri sindrome diabeticheskoi stopy v ambulatornykh usloviyakh. Ambulatornaya khirurgiya. Statsionarozameshchayushchie tekhnologii. 2004; 16 (4): 163–4. Russian.
18. Meylan G, Tschantz P. [Surgical wounds with or without dressings. Prospective comparative study]. Ann Chir. 2001 Jun; 126 (5): 459–62. French.
19. Zhilina SV, Mironov AYu, Polikarpova SV, Pivkina NV. [Monitoring of Streptococcus isolated in pyoinflammatory diseases of the skin and soft tissue]. Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik «Chelovek i ego zdorov'e». 2009; (2): 46–53. Russian.
20. Tillotson GS, Draghi DC, Sahm DF, Tomfohrde KM, Del Fabro T, Critchley IA. Susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from skin and wound infections in the United States 2005–07: laboratory-based surveillance study. J Antimicrob Chemother. 2008 Jul; 62 (1): 109–15.
21. Sazhina NN, Lapshin PV, Zagoskina NV, Korotkova EI, Misin VM. [Comparative analysis of kalanchoe juice antioxidatic activity]. Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 2013; (3): 113–9. Russian.
22. Akinsulire OR, Aibinu IE, Adenipekun T, Adelowotan T, Odugbemi T. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants Bryophyllum pinnatum and Kalanchoe crenata. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007 Feb 16; 4 (3): 338–44.
23. Garcês HM, Champagne CE, Townsley BT, Park S, Malhó R, Pedroso MC, et al. Evolution of asexual reproduction in leaves of

the genus Kalanchoe. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 25; 104 (39): 15578–83.
24. Truesdale MR, Toldi O, Scott P. The effect of elevated concentrations of fructose 2,6-bisphosphate on carbon metabolism during deacidification in the crassulacean acid metabolism plant Kalanchoe daigremontiana. Plant Physiol. 1999 Nov; 121 (3): 957–64.
25. Grigoryan AYu, Bezhin AI, Pankrusheva TA, Ivanov AV, Zhilyaeva LV, Kobzareva EV, et al. [The immobilized form of antiseptics for the treatment of purulent wounds in the experiment]. Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovie". 2011; (4): 25–33. Russian.
26. Sanikhani M, Mibus H, Stummann BM, Serek M. Kalanchoe blossfeldiana plants expressing the Arabidopsis etr1-1 allele show reduced ethylene sensitivity. Plant Cell Rep. 2008 Apr; 27 (4): 729–37.
27. Zakharchenko NS, Lebedeva AA, Bur'yanov YaI, inventors; Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, assignee. Sposob polucheniya geneticheski modifitsirovannykh rastenii kalankhoe, ekspressiruyushchikh gen tsekropina P1. Russian Federation patent RU 2445768. 2012 Mar 27. Russian.
28. Martemyanov EA, Shirin AS, Grudkov AT. Synthesis cloning and expression of genes for antibacterial peptides: cecropin, magainin, and bombinin. Biotechnol Lett. 1996; 18 (12): 1357–62.
29. Pillai A, Ueno S, Zhang H, Lee JM, Kato Y. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode Ascaris suum. Biochem J. 2005 Aug 15; 390 (Pt 1): 207–14.
30. Zakharchenko NS, Rukavtsova EB, Gudkov AT, Yukhmanova AA, Shkol'naya LA, Kado CI, et al. Expression of the artificial gene encoding anti-microbial peptide cecropin P1 increases the resistance of transgenic potato plants to potato blight and white rot. Dokl Biol Sci. 2007 Jul–Aug; 415: 267–9.
31. Shin SY, Kang JH, Jang SY, Kim Y, Kim KL, Hahm KS. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. Biochim Biophys Acta. 2000 Feb 15; 1463 (2): 209–18.
32. Kutsik RV, Zuzuk BM. Kalankhoe peristoe (Briofillyum chashechkovyi) Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. Analiticheskii obzor. Provizor [Internet]. 2004 [cited 2017 Feb 27]; (4–6). Available from: http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N4/art_27.php?part_code=68&art_code=4029;
33. Adenike K, Eretan OB. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of Kalanchoe crenata (Andr.) Haw. J Biochem Mol Biol. 2004 Mar 31; 37 (2): 229–33.

КЛЮЧЕВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЗА 2011–2015 ГГ.

А. С. Анискевич[1] ✉, Р. А. Хальфин[2]

[1] Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва

[2] Высшая школа управления здравоохранением,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

Определены 16 ключевых критериев результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения, характеризующих результативность и востребованность научных исследований, развитие кадрового потенциала, интеграцию в мировое научное пространство, распространение научных знаний и повышение престижа науки, ресурсное обеспечение деятельности организаций. В рамках классификационного подхода рассмотрены медицинские научные учреждения, показаны их особенности. Представлена системная оценка результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения. Продемонстрирована высокая значимость показателей, отражающих результативность и востребованность научных исследований. Отмечены недостаточность применяемых параметров и отсутствие системного подхода к анализу кадрового потенциала. Доказана важная роль дополнительных критериев оценки, составивших 37,5 % общей доли ключевых показателей.

Ключевые слова: результативность деятельности научной организации, ключевые показатели результативности, научная организация в сфере здравоохранения, государственная научная организация

✉ **Для корреспонденции:** Анискевич Анна Сергеевна
Рахмановский пер., д. 3, г. Москва, 127994; anna.aniskevich@yandex.ru

Статья получена: 10.02.2017 **Статья принята в печать:** 17.02.2017

KEY PERFORMANCE INDICATORS FOR HEALTHCARE RESEARCH ORGANIZATIONS BETWEEN 2011 AND 2015

Aniskevich AS[1] ✉, Halfin RA[2]

[1] Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

[2] Higher School of Healthcare Administration,
I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

In this work we identify 16 key indicators to evaluate the performance of healthcare research organizations. These indicators comprehensively characterize such aspects of performance as research output and relevance, human resource development, integration into the international scientific community, distribution of scientific knowledge, promotion of the prestige of science, and resource provision. Below, we review the existing classification of medical research institutions and their key features. We present the results of the comprehensive performance evaluation of healthcare research organizations. We demonstrate the significance of the proposed indicators that accurately reflect the output and relevance of scientific research and stress that indicators currently used for performance evaluation are insufficient. We also emphasize the need for a systemic approach to personnel capacity assessment and confirm the importance of additional evaluation criteria that amount to 37.5 % of all key indicators.

Keywords: research organization performance, key performance indicators, healthcare research organization, state-funded research organization

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna Aniskevich
Rakhmanovsky per., d. 3, Moscow, Russia, 127994; anna.aniskevich@yandex.ru

Recieved: 10.02.2017 **Accepted:** 17.02.2017

Оценка результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения крайне значима и актуальна для дальнейшего развития научно-исследовательского потенциала России. Важность проведения данного анализа продиктована задачами повышения эффективности на фоне модернизации государственного сектора науки [1, 2]. С другой стороны, современные теоретические и практические разработки и инструменты оценки, применяемые к медицинским научным учреждениям, зачастую не позволяют провести комплексный мониторинг их деятельности.

Особенностью российского методологического подхода к анализу результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения, в отличие от ряда западных стран, является использование большого числа критериев [3, 4]. Типовая методика оценки, применяемая в России [2], основана преимущественно на количественных, а не на качественных показателях. Для системного мониторинга используют дополнительные критерии, в том числе для учреждений, имеющих коечный фонд. Поскольку результат проведенного анализа непосредственно влияет на принятие решения о финансировании, выявление ключевых критериев представляется особенно актуальным.

Медицинские научные организации имеют характерную специфику деятельности и обладают важными отличиями от остальных учреждений науки [5, 6].

Утвержденные показатели оценки результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения включают мониторинг следующих направлений:

- результативность и востребованность научных исследований;
- развитие кадрового потенциала;
- интеграция в мировое научное пространство, распространение научных знаний и повышение престижа науки;
- ресурсное обеспечение деятельности научной организации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы показатели результативности 55 научных организаций, подведомственных Минздраву России, за период 2011–2015 гг.

В соответствии с принятой классификацией, научные организации, подведомственные Минздраву России (n = 55), были разделены на имеющие (n = 41) и не имеющие коечный фонд (n = 4), экспертные и социально значимые учреждения (n = 10).

Статистическая обработка выполнена с использованием пакета программ Statistica 10.0. Для проверки статистических гипотез о виде распределения применяли критерий Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Установлено, что во всех случаях данные не подчиняются нормальному закону распределения, поэтому для статистического анализа использованы непараметрические критерии.

Для определения ключевых показателей результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения были применены критерий Краскела–Уоллиса и медианный тест. Дополнительно проведено сравнение 2011 и 2015 г. по критерию Манна–Уитни и обнаружено, что именно эти показатели достаточно изменяются.

Корреляционный анализ осуществлен с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена. Показатели, меняющиеся в динамике, были включены в корреляционный анализ с фоновыми показателями за 2011 г., поскольку он является начальной точкой отсчета. За уровень статистической значимости был взят $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Большинство научных учреждений, подведомственных Минздраву России, имеют коечный фонд (74,5%), однако это не упрощает процедуру оценки, поскольку невозможно применить показатели, характеризующие оказание медицинской помощи, к остальным научным организациям. В связи с этим для анализа результативности деятельности учреждений науки, имеющих коечный фонд, применяют дополнительные критерии.

Статистический анализ 5-летней динамики (2011–2015 гг.) критериев результативности позволил выявить 16 ключевых показателей ($p < 0,05$). Структура выделенных критериев и их доля в общем числе параметров представлены на рис. 1 и 2.

За анализируемый период 2011–2015 гг. выявлены следующие ключевые показатели.

Ключевые показатели результативности и востребованности научных исследований:

1. Совокупный импакт-фактор журналов, в которых опубликованы статьи организации. Следует отметить, что для показателя отмечена умеренная корреляционная связь с численностью докторов наук ($r_s = 0,455$, $p < 0,01$), внутренними ($r_s = 0,449$, $p < 0,01$) и внешними ($r_s = 0,411$, $p < 0,01$) текущими затратами на научные исследования и разработки, числом публикаций организации в журналах,

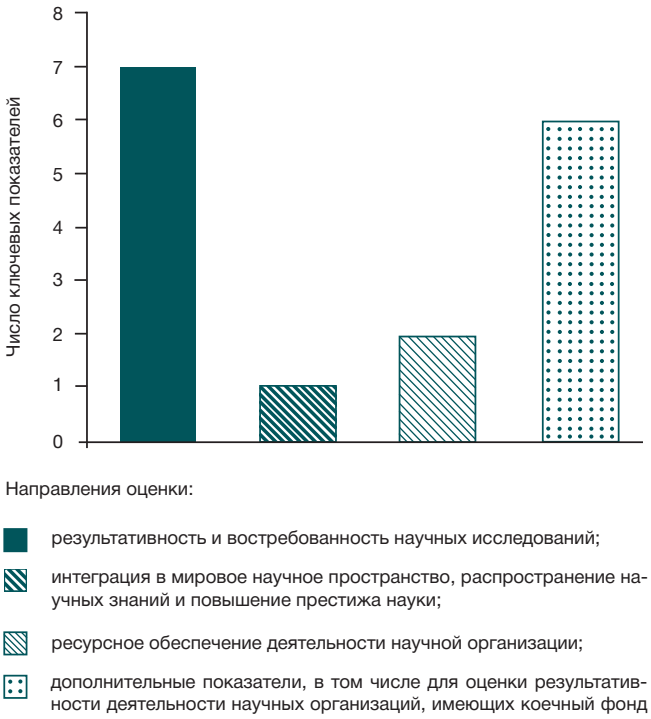


Рис. 1. Структура ключевых показателей оценки результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения

Рис. 2. Доля ключевых показателей оценки результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения в общем числе показателей по каждому направлению

индексируемых международной базой Web of Science (r_s = 0,406, p < 0,01).

2. Количество использованных результатов интеллектуальной деятельности, переданных по лицензионному договору (соглашению). Выявлена умеренная корреляция показателя с внутренними текущими затратами на научные исследования и разработки, в том числе на поисковые исследования (r_s = 0,475, p < 0,01).

3. Количество использованных результатов интеллектуальной деятельности, внесенных в качестве вклада в уставной капитал.

4. Число малых инновационных предприятий, созданных с участием организации.

5. Совокупная среднесписочная численность работников малых инновационных предприятий.

6. Совокупный доход малых инновационных предприятий.

7. Финансовая результативность научной организации по источникам дохода. Прослеживается слабая связь с внутренними текущими затратами на научные исследования и разработки (r_s = 0,302, p < 0,05), в том числе положительная корреляция с фундаментальными (r_s = 0,351, p < 0,01) и отрицательная — с поисковыми (r_s = –0,324, p < 0,05) исследованиями.

Ключевой показатель интеграции в мировое научное пространство, распространения научных знаний и повышения престижа науки

Единственным ключевым показателем определено количество обращений (посещаемость) официальных сайтов и (или) страниц организации, размещенных в сети Интернет. Выявлена умеренная корреляция критерия с количеством положительных и нейтральных упоминаний организации в средствах массовой информации федерального уровня (r_s = 0,357, p < 0,01), в том числе в интернет-изданиях (r_s = 0,325, p < 0,05), и числом публикаций организации в изданиях, индексируемых РИНЦ (r_s = 0,339, p < 0,05).

Ключевые показатели ресурсного обеспечения деятельности научной организации:

1. Стоимость основных средств и нематериальных активов, в том числе зданий и сооружений, машин и оборудования, нематериальных активов. Для показателя выявлена умеренная корреляционная связь с финансовой результативностью научной организации по видам выполненных работ и оказанных услуг, в том числе по товарам, работам и услугам производственного характера (r_s = 0,491, p < 0,01).

2. Внутренние текущие затраты на фундаментальные научные исследования. Отмечена корреляция с финансовой результативностью научной организации по видам выполненных работ и оказанных услуг: по числу исследований и разработок (r_s = 0,548, p < 0,01); с численностью работников, выполнявших исследования и разработки (r_s = 0,516, p < 0,01), в том числе исследователей (r_s = 0,418, p < 0,01), из них кандидатов наук (r_s = 0,405, p < 0,01), докторов наук (r_s = 0,368, p < 0,01), в возрасте до 39 лет (r_s = 0,505, p < 0,01).

Все ключевые показатели ресурсного обеспечения деятельности научной организации взаимосвязаны с финансовой результативностью научной организации по видам выполненных работ, оказанных услуг и по источникам дохода.

Ключевые дополнительные показатели результативности деятельности научной организации:

1. Число применяемых научных критических технологий из перечня, одобренного Научным советом Минздрава России. Отмечена корреляция показателя с числом публикаций организации в изданиях, индексируемых международной информационно-аналитической системой Scopus (r_s = 0,367, p < 0,01), и числом инновационных медицинских технологий, одобренных Научным советом Минздрава России, используемых в учреждении (r_s = 0,356, p < 0,01). Прослеживается слабая корреляционная связь с количеством положительных и нейтральных упоминаний организации в средствах массовой информации федерального уровня (r_s = 0,295, p < 0,05), в том числе в федеральных печатных изданиях, теле- и радиоСМИ (r_s = 0,291, p < 0,05), и численностью исследователей, направленных на работу в ведущие российские и международные научные и научно-образовательные организации (r_s = 0,268, p < 0,05).

2. Доля высококвалифицированных врачей от общего числа врачей. Интересна отрицательная корреляционная взаимосвязь показателя с общим количеством научных, конструкторских и технологических произведений (r_s = –0,273, p < 0,05), количеством положительных и нейтральных упоминаний организации в СМИ (r_s = –0,311, p < 0,05), финансовой результативностью научной организации по видам выполненных работ и оказанных услуг — по исследованиям и разработкам (r_s = –0,308, p < 0,05), и числом подготовленных проектов стандартов, порядков оказания медицинской помощи, клинических рекомендаций и других нормативных актов (r_s = –0,276, p < 0,05).

3. Число инновационных медицинских технологий, одобренных Научным советом Минздрава России, используемых в учреждении. Выявлена корреляция показателя с числом публикаций организации в изданиях, индексируемых Scopus (r_s = 0,367, p < 0,01), с количеством созданных результатов интеллектуальной деятельности (r_s = 0,406, p < 0,01), в том числе имеющих государственную регистрацию и (или) правовую охрану в Российской Федерации (r_s = 0,392, p < 0,01), процентом жителей других регионов, которым была оказана высокотехнологичная медицинская помощь (ВМП) в данном учреждении (r_s = 0,360, p < 0,01).

4. «Федеральность» учреждения: процент жителей других регионов, которым была оказана специализированная медицинская помощь в данном учреждении. Установлена умеренная корреляция показателя с числом жителей других регионов, которым была оказана ВМП (r_s = 0,474, p < 0,01), и количеством субъектов Российской Федерации, жители которых пролечены в отчетном году (r_s = 0,437, p < 0,01).

5. Процент расходов на оказание медицинской помощи по ОМС от общих расходов. Показатель коррелирует с количеством созданных результатов интеллектуальной деятельности (r_s = 0,350, p < 0,01), в том числе имеющих государственную регистрацию и (или) правовую охрану в Российской Федерации (r_s = 0,459, p < 0,01), с финансовой результативностью научной организации по источникам дохода (r_s = 0,369, p < 0,01), с внутренними текущими затратами на фундаментальные научные исследования (r_s = 0,417, p < 0,01).

6. Число подготовленных проектов стандартов оказания медицинской помощи, проектов порядков оказания медицинской помощи, клинических рекомендаций

(протоколов лечения), других нормативных актов. Выявлена корреляционная связь показателя с числом публикаций организации в изданиях, индексируемых Scopus (r_s = 0,384, p < 0,01), с финансовой результативностью научной организации по видам выполненных работ и оказанных услуг, в том числе образовательных услуг (r_s = 0,394, p < 0,01), подготовкой специалистов по программам дополнительного профессионального образования по уникальным технологиям по профилю научной организации (r_s = 0,449, p < 0,01), процентом жителей других регионов, которым была оказана ВМП (r_s = 0,358, p < 0,01).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ показателей результативности научных организаций, подведомственных Минздраву России, позволил установить 16 ключевых критериев, большинство (43,75 %) из которых характеризуют результативность и востребованность научных исследований.

Наукометрический анализ, представляющий особую важность для системной оценки [7–9], выявил, что среди анализируемых критериев (число публикаций организации в изданиях, индексируемых РИНЦ, Web of Science, Scopus; совокупная цитируемость публикаций организации и др.) именно совокупный импакт-фактор журналов, в которых опубликованы статьи организации, является ключевым показателем. Вероятно, это связано с более осознанным выбором изданий, поскольку публикации в высокорейтинговых журналах, в том числе иностранных, повышают не только цитируемость авторов, но и заинтересованность зарубежных коллег российскими исследованиями и дальнейшим сотрудничеством.

Инновационная модель развития российской науки подразумевает ее более тесную взаимосвязь с экономическим сектором [10]. На этом фоне особая роль принадлежит малым инновационным предприятиям и ключевым показателям, отражающим их деятельность. Однако за изученный период 2011–2015 гг. медицинские учреждения науки практически не проявляли интереса к коммерциализации интеллектуальной продукции. Установлено, что только 14,5 % организаций, имеющих коечный фонд, создали малые инновационные предприятия.

Стандартная оценка кадрового потенциала научных организаций в сфере здравоохранения включает четыре количественных показателя, ни один из которых не является ключевым. Отсутствие качественных факторов и разная значимость исследуемых параметров создают препятствия полноценному анализу. Для эффективной оценки кадрового потенциала, согласно ряду исследователей [5, 11], необходим системный подход, включающий мониторинг профессиональной компетентности, обучаемости, условий и размера оплаты труда и многих других показателей.

Поскольку результативность учреждений напрямую зависит от выполняемых исследований и других работ, связанных с основной деятельностью организации, а также от соответствия состояния отечественной науки современному мировому уровню [12–15], необходима разработка качественных критериев для данного направления.

За рассматриваемый период 2011–2015 гг., несмотря на уменьшение упоминаний научных организаций в средствах массовой информации, установлено резкое повышение посещаемости официальных сайтов медицинских научных учреждений. Предположительно, это связано с возросшей интернет-активностью заинтересованных лиц.

Использование дополнительных критериев оценки результативности деятельности научных организаций в сфере здравоохранения доказало свою целесообразность — они составили 37,5 % общей доли ключевых показателей. Интересно отметить связь критерия, отражающего число применяемых научных критических технологий из перечня, одобренного Научным советом Минздрава России, с числом публикаций организации в изданиях, индексируемых международной информационно-аналитической системой Scopus, и с численностью исследователей, направленных на работу в ведущие российские и международные научные и научно-образовательные организации.

ВЫВОДЫ

При оценке результативности деятельности учреждений науки в сфере здравоохранения за 2011–2015 гг. были установлены 16 ключевых показателей, среди которых особенно значимы критерии, отражающие результативность и востребованность научных исследований.

В ходе оценки подтверждена актуальность дополнительных критериев. Полученные данные наглядно демонстрируют, что для дальнейшего развития научного потенциала организаций крайне важны применяемые научные критические и инновационные медицинские технологии из перечня, одобренного Научным советом Минздрава России, подготовленные проекты стандартов оказания медицинской помощи, проекты порядков оказания медицинской помощи и клинических рекомендаций.

Для учреждений, имеющих коечный фонд, ключевыми дополнительными показателями выступили доля высококвалифицированных врачей, процент жителей других регионов, которым была оказана специализированная медицинская помощь, и процент расходов на оказание медицинской помощи по ОМС.

Показана недостаточность стандартных показателей анализа кадрового потенциала и необходимость в создании не только количественных, но и качественных критериев.

Литература

1. Постановление Правительства РФ от 08.04.2009 № 312 (ред. от 29.12.2016) «Об оценке и о мониторинге результативности деятельности научных организаций, выполняющих научно-исследовательские, опытно-конструкторские и технологические работы гражданского назначения».
2. Приказ Минобрнауки России от 05.03.2014 № 161 (ред. от 17.07.2015) «Об утверждении типового положения о комиссии по оценке результативности деятельности научных организаций, выполняющих научно-исследовательские, опытно-конструкторские и технологические работы гражданского назначения, и типовой методики оценки результативности деятельности научных организаций, выполняющих научно-исследовательские, опытно-конструкторские и технологические работы гражданского назначения».
3. Проничкин С. В., Тихонов И. П. Разработка системы критериев и методических подходов к экспертной оценке эффек-

тивности деятельности научных организаций. Нац. интересы: приоритеты и безопасность. 2013; (37): 13–8.
4. Филонюк В. А., Сачек М. М., Малахова И. В., Дудина Т. В., Ёлкина А. И. Комплексная оценка результативности медицинской науки и определение рейтинга научных организаций за рубежом и в Беларуси. Вопр. орг. и информ. здравоохр. 2013; (2): 20–30.
5. Вялков А. И., Глухова Е. А., Мартынчик С. А. Модель мониторинга формирования инновационных компетенций кадрового состава научной медицинской организации, ориентированного на создание критически важных технологий. Соц. аспекты здоровья насел. 2015; 42 (2): 17.
6. Мартынчик С. А., Глухова Е. А., Галустова Л. Р. Требования к построению системы для оценки результативности и потенциала научной деятельности на уровне организации. Соц. аспекты здоровья насел. 2013; 32 (4): 10.
7. Оганов Р. Г., Трущелев С. А. Наукометрические подходы к анализу результатов научно-исследовательской деятельности. Кардиоваскул. тер. и профил. 2012; 11 (2): 90–5.
8. Стародубов В. И., Кузнецов С. Л., Куракова Н. Г., Цветкова Л. А., Арефьев П. Г., Иванов А. В. и др. Публикационная активность российской медицинской науки в фокусе актуальной научной политики: оценка достижимости целевых показателей. Вестн. РАМН. 2013; (3): 8–14.
9. Шарабчиев Ю. Т. Продуктивность ученых: инструменты оценки. Наука и инновации. 2013; 119 (1): 4–8.
10. Зубова Л. Г., Андреева О. Н., Антропова О. А. К вопросу о результативности деятельности государственных научных организаций (по оценкам социологического мониторинга 2005–2011 гг.). Инновации. 2012; 170 (12): 51–60.
11. Кучеренко В. З., Мартынчик С. А., Глухова Е. А. Экспертное оценивание и индикаторы качества деятельности специалистов научной (медицинской) организации по профилю общественное здоровье и управление здравоохранением. Пробл. управ. здравоохр. 2010; (5): 24–9.
12. Кузнецова Т. Е. Правовой фактор научно-технического развития России: область неопределенности. В кн.: Алахвердян А. Г., Семенова Н. Н., Юревич А. В., редакторы. Науковедение и новые тенденции в развитии российской науки. М.: Логос; 2005. с. 122–38.
13. Розин В. М. Наука: происхождение, развитие, типология, новая концептуализация. М.: МПСИ, Воронеж: МОДЭК; 2008. 600 с.
14. Куракова Н. Г., Колин С. К., Оливер Е. А. Вневедомственная система оценки научных медицинских организаций в парадигме двадцатилетней давности. Менеджер здравоохр. 2014; (8): 29–36.
15. Ларин С. Н., Лазарева Л. Ю., Островский С. М. Формализованная модель и методика многокритериальной оценки эффективности инновационной деятельности научных организаций. Инновации в науке. 2013; (18–1): 6–19.

References

1. Resolution of the Russian Government No. 312 of April 8, 2009 (revised 2016 December 29) “Ob otsenke i o monitoringe rezul'tativnosti deyatel'nosti nauchnykh organizatsii, vypolnyayushchikh nauchno-issledovatel'skie, opytno-konstruktorskie i tekhnologicheskie raboty grazhdanskogo naznacheniya”. Russian.
2. Order of the Russian Ministry of Education and Science No. 161 of March 5, 2014 (revised 2015 July 17) “Ob utverzhdenii tipovogo polozheniya o komissii po otsenke rezul'tativnosti deyatel'nosti nauchnykh organizatsii, vypolnyayushchikh nauchno-issledovatel'skie, opytno-konstruktorskie i tekhnologicheskie raboty grazhdanskogo naznacheniya, i tipovoi metodiki otsenki rezul'tativnosti deyatel'nosti nauchnykh organizatsii, vypolnyayushchikh nauchno-issledovatel'skie, opytno-konstruktorskie i tekhnologicheskie raboty grazhdanskogo naznacheniya”. Russian.
3. Pronichkin SV, Tikhonov IP. Razrabotka sistemy kriteriev i metodicheskikh podkhodov k ekspertnoy otsenke effektivnosti deyatel'nosti nauchnykh organizatsii. Natsional'nye interesy: prioritety i bezopasnost'. 2013; (37): 13–8. Russian.
4. Filonyuk VA, Sachek MM, Malakhova IV, Dudina TV, Elkina AI. Kompleksnaya otsenka rezul'tativnosti meditsinskoi nauki i opredelenie reitinga nauchnykh organizatsii za rubezhom i v Belarusi. Voprosy organizatsii i informatizatsii zdravookhraneniya. 2013; (2): 20–30. Russian.
5. Vyalkov AI, Glukhova EA, Martynchik SA. [Monitoring model for developing personnel innovative competences of the scientific medical organization, focused on producing critically important technologies]. Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya. 2015; 42 (2): 17. Russian.
6. Martynchik SA, Glukhova EA, Galustova LR. [Requirements for developing a system to assess performance and potential of scientific activities at the organizational level]. Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya. 2013; 32 (4): 10. Russian.
7. Oganov RG, Trushchelev SA. [Scientometric approaches to the analysis of research results]. Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2012; 11 (2): 90–5. Russian.
8. Starodubov VI, Kuznetsov SL, Kurakova NG, Tsvetkova LA, Aref'ev P.G., Ivanov A.V., et al. [Publication activity of the Russian medicine in focus of national science policy: estimating the feasibility of policy targets]. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2013; (3): 8–14. Russian.
9. Sharabchiev YuT. Produktivnost' uchenykh: instrumenty otsenki. Nauka i innovatsii. 2013; 119 (1): 4–8. Russian.
10. Zubova LG, Andreeva ON, Antropova OA. [To the question of the efficient activities of the public R&D institutions (basing on sociological monitoring of 2005–2011 years)]. Innovatsii. 2012; 170 (12): 51–60. Russian.
11. Kucherenko VZ, Martynchik SA, Glukhova EA. Ekspertnoe otsenivanie i indikatory kachestva deyatel'nosti spetsialistov nauchnoi (meditsinskoi) organizatsii po profilyu obshchestvennoe zdorov'e i upravlenie zdravookhraneniem. Problemy upravleniya zdravookhraneniem. 2010; (5): 24–9. Russian.
12. Kuznetsova TE. Pravovoi faktor nauchno-tekhnicheskogo razvitiya Rossii: oblast' neopredelennosti. In: Alakhverdyan AG, Semenova NN, Yurevich AV, editors. Naukovedenie i novye tendentsii v razvitii rossiiskoi nauki. Moscow: Logos; 2005. p. 122–38. Russian.
13. Rozin VM. Nauka: proiskhozhdenie, razvitie, tipologiya, novaya kontseptualizatsiya. Moscow: Moscow psychologic-social institute, Voronezh: MODEK; 2008. 600 p. Russian.
14. Kurakova NG, Kolin SK, Oliver EA. [Independent validation system of scientific medical organizations in the paradigm of twenty years remoteness]. Menedzher zdravookhraneniya. 2014; (8): 29–36. Russian.
15. Larin SN, Lazareva LYu, Ostrovsky SM. [Formalized model and procedure of multicriterion evaluation of efficiency of scientific organizations’ innovation activity]. Innovatsii v nauke. 2013; (18–1): 6–19. Russian.