

ISSN 0372.9311

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И
ИММУНОБИОЛОГИИ

Издательский
дом



С-ИНФО

4 2016

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY



4 602607 000085

- coccal infections caused by an ST1407-related clone harbouring mosaic penA alleles in Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, 68 (7): 1567-1571.
5. European centre for disease prevention and control. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* — results from a pilot study 2010-2011. Stockholm, ECDC, 2012.
 6. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. Geneva, WHO, 2012.
 7. Jeverica S., Golparian D., Maticic M. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006–12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, 69: 1517-1525.
 8. Kushnir A.V., Muminov T.A., Bayev A.I. et al. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Almaty, Kazakhstan, by VNTR analysis, Opa-typing and NG-MAST. *Infection Genetics Evolution.* 2012. 12: 570-576.
 9. Martin I.M., Ison C.A., Aanensen D.M. et al. Rapid sequencing-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* 2004, 189 (8): 1497-1505.
 10. Thakur S.D., Levett P.N., Horsman G.B. et al. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Saskatchewan, Canada: utility of NG-MAST in predicting antimicrobial susceptibility regionally. *Sex. Transm. Infect.* 2014, 90 (4): 297-302.
 11. Unemo M., Vorobieva V., Firsova N. et al. *Neisseria gonorrhoeae* population in Arkhangelsk, Russia: phenotypic and genotypic heterogeneity. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007, 13 (9): 873-878.

Поступила 04.03.16

Контактная информация: Дерябин Дмитрий Геннадьевич, д.м.н., проф., 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6, р.т. (499)785-20-40

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Н.К.Ахматова*¹, *В.Г.Хоменков*¹, *Е.В.Волкова*², *Э.А.Ахматова*^{1,3},
*И.А.Семочкин*¹, *Т.С.Перепанова*², *В.В.Зверев*^{1,3}

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛИЗАТЫ *ESCHERICHIA COLI* СТИМУЛИРУЮТ ПРОДУКЦИЮ ДЕФЕНСИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²НИИ урологии и интервенционной радиологии, Москва; ³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Изучение влияния препарата микробного происхождения на основе лизата бактерий *Escherichia coli* (Уро-Ваксом) на продукцию дефенсинов (HNP1-3, лактоферрин — LF) и IgM/IgA у больных с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей (РИНМП). **Материалы и методы.** В исследование включены 40 женщин с РИНМП в возрасте от 18 до 68 лет, которые получали монотерапию препаратом «Уро-Ваксом» (бактериальный лизат 18 штаммов *E. coli*), и 26 здоровых женщин. Уровень дефенсинов и иммуноглобулинов крови определяли с помощью твердофазной ИФА тест-системы (HNP1-3, LF, Elisa Kit Hycult biotech, Netherlands; Serazym Human IgA, IgM, Germany). **Результаты.** У больных РИНМП отмечался сниженный уровень дефенсинов HNP1-3 и LF, свидетельствующий о хроническом течении воспалительного процесса в организме. Применение лизата *E. coli* приводило к нормализации данных показателей в сыворотке крови женщин. Уровень IgM и IgA в крови больных оставался в пределах нормальных значений, и применение бактериального лизата не влияло на эти показатели. **Заключение.** Препарат «Уро-Ваксом» на основе лизата бактерий *E. coli* обладает иммунокорректирующим действием при лечении больных РИНМП.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 50—55

Ключевые слова: рецидивирующая инфекция нижних мочевых путей, лизат *Escherichia coli*, HNP1-3, лактоферрин, иммуноглобулины

N.K.Akhmatova¹, V.G.Khomenkov¹, E.V.Volkova², E.A.Akhmatova^{1,3},
I.A.Semochkin¹, T.S.Perepanova², V.V.Zverev^{1,3}

BACTERIAL LYSATES OF *ESCHERICHIA COLI* STIMULATE PRODUCTION OF DEFENSINS BY PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Research Institute of Urology and Intervention Radiology, Moscow; ³Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Study effect of a microbial-origin preparation based on *Escherichia coli* bacteria lysate (Uro-Vaksom) on defensin production (HNP1-3, lactoferrin — LF) and IgM/IgA in patients with recurring infections of lower urinary tract (RILUT). **Materials and methods.** 40 women with RILUT aged 18 — 68 years, who received monotherapy with Uro-Vaksom (bacterial lysate of 18 *E. coli* strains), and 26 healthy women were included into the study. Levels of defensins and immunoglobulins in blood were determined using ELISA (HNP1-3, LF, Elisa Kit, Hycult biotech, Netherlands; Serazym Human IgA, IgM, Germany). **Results.** A reduced level of defensins HNP1-3 and LF was noted in patients with RILUT, that gives evidence on chronic course of the inflammatory process on the organism. Use of *E. coli* lysate resulted in normalization of these parameters in blood sera of women. IgM and IgA levels in blood of the patients remained within normal values, and use of the bacterial lysate did not affect them. **Conclusion.** Use of Uro-Vaksom based on *E. coli* bacteria lysate has immune-correcting effect during therapy of patients with RILUT.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 50—55

Key words: recurring infection of lower urinary tract, *Escherichia coli* lysate, HNP1-3, lactoferrin, immunoglobulins

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечается неуклонный рост хронических воспалительных заболеваний, в том числе рецидивирующей инфекции нижних мочевых путей (РИНМП). Это, прежде всего, связано с появлением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, в частности уропатогенной *Escherichia coli*, которая является основным возбудителем инфекции мочевых путей. Учитывая невысокую эффективность антибактериальной терапии РИНМП, большое значение приобретают методы, направленные на активацию защитных механизмов иммунной системы.

Показано, что *in vitro* препарат «Уро-Ваксом», который представляет лизат бактерий *E. coli*, стимулирует активность макрофагов и нейтрофилов, активизирует созревание дендритных клеток и увеличивает экспрессию адгезивных молекул нейтрофилами [1]. Поэтому представляет интерес изучение влияния данного препарата на некоторые звенья иммунитета у пациентов с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей.

Первым барьером на пути инфекции являются врожденные эффекторы иммунного ответа. Альфа-дефенсины HNP1-3 нейтрофилов человека принадлежат к семейству катионов трисульфид-содержащих микробицидных пептидов [5, 6]. Кроме микробицидной активности пептиды оказывают хемотаксическое, иммуномодулирующее и цитотоксическое действие и участвуют в защитной и воспалительной реакции [6].

Человеческий лактоферрин (LF) является гликопротеином, который обнаруживается во вторичных гранулах нейтрофилов. Кроме того, лактоферрин содержится в эпителии и большинстве жидкостей организма и секретах, он играет важную роль в иммунной системе, помогая бороться с инфекциями [2]. Данный гликопротеин обладает способностью связывать железо и обладает

широким спектром ферментативной активности: ДНКазы, РНКазы, АТФазы, фосфатазы и мальто-олигосахарид гидролазы. Лактоферрин является естественным антибактериальным, противогрибковым и противовирусным белком, антиоксидантом, а также обладает иммуномодулирующими свойствами [2].

Моча или грудное молоко здоровых лиц содержит ~ 30 нг/мл и ~ 500 мкг/мл LF, соответственно [7]. При инфекции концентрация LF может повыситься в 10 — 100 раз. В фекалиях здоровых людей может быть обнаружено ~ 1 мкг/г LF, в то время как в фекалиях пациентов с раком толстой кишки или воспалительными заболеваниями кишечника (IBD), уровень LF находится в диапазоне ~ 75 — 310 мкг/г. Фекальный лактоферрин можно использовать в качестве чувствительного и специфического маркера кишечного воспаления [8, 10]. Сочетание нескольких маркеров, таких как калпротектин, дефенсин, эластаза, МРО, I-FABP и MAdCAM может быть информативным для классификации IBD, а также для определения степени дифференцировки опухоли и для подтверждения ремиссии/ответа на лечение. Таким образом, человеческий лактоферрин является чувствительным неинвазивным инструментом для мониторинга активности заболевания [Jang Y.S. et al., 2014].

Цель работы — изучение влияния лизата бактерий *E. coli* (препарат «Уро-Ваксом») на продукцию дефенсинов (HNP1-3, LF) и IgM/IgA у больных с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А.Лопаткина и НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова с 2013 по 2015 гг. В исследование были включены 66 женщин, из них 40 женщин с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей в возрасте от 18 до 68 лет. Средняя продолжительность заболевания — 3,8 лет. В контрольную группу вошли 26 практически здоровых женщин.

В исследование не включали пациенток с циститом, имеющих сопутствующие хронические заболевания в фазе обострения, инфекции, передаваемые половым путем (хламидиоз, микоплазмоз, гонорея, трихомониаз, папилломавирусная инфекция), а также беременных женщин. Все исследования выполнены после получения информированного согласия пациенток.

Оценка клинических и лабораторных данных помимо клинических анализов мочи и крови включала бактериологический анализ мочи и характеристику врожденного и адаптивного иммунного ответа в сыворотке крови до включения в исследование (исходный), через 1 — 6 мес. после начала лечения.

Бактериологические исследования проводились в микробиологической лаборатории Национального агентства по клинической фармакологии.

Ранее все пациентки получали антимикробную терапию. В основном, в качестве монотерапии пациентки использовали фосфомицина трометамол, норфлоксацин; фуразидин и ципрофлоксацин. Мы проводили монотерапию препаратом «Уро-Ваксом», который представляет лиофилизированный бактериальный лизат 18 штаммов *E. coli*.

«Уро-Ваксом» назначали утром натощак по одной капсуле в день (6 мг) в течение 90 дней в соответствии со стандартной схемой приема.

Забор крови для иммунологических исследований осуществляли натощак в утренние часы. Полученную сыворотку хранили при минус 70°С до проведения анализа. Гуморальный профиль иммунной системы определяли в от-

ношении эф
(IgM, IgA) им

Уровень д
фазной ИФА
Serazym Hun
пользованием
уровня циток
исследования
ными считал

РЕЗУЛЬТА

У больны
чался снижен
нению со здо
паратом на ос
превышающе
Спустя еще м
группы (здор
(6 мес.) уrove

Азурофил
фильный пе
[Baroncelli S.
ся уникальн
чества дефенс

Активаци
[Agratti C. et a
источником I
ма при инфек
наблюдается
HNP1-3, в то
расти до 10 м
исследований
тельствовать
женщин и хар
отражая несо

В наших и
было снижен
мл), что также
коцитов у жен
показатель по
только к 3 мес
снижаться, и
в 1,3 раза (150
эти сроки у п
(до лечения) и

Таким обр
детельствующ
низме с низк
иммунитета. I
показателей в
Кроме ука

ношении эффекторов врожденного (HNP1-3, лактоферрин) и адаптивного (IgM, IgA) иммунитета.

Уровень дефенсинов и иммуноглобулинов определяли с помощью твердофазной ИФА тест-системы (HNP1-3, LF, Elisa Kit, Hycult biotech, Netherlands; Serazym Human IgA, IgM, Germany). Анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 10. Статистическая значимость различий уровня цитокинов между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Манна-Уитни. Статистически достоверными считали различия при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей отмечался сниженный уровень HNP1-3 в 3,45 раза (32,23 пг/мл, $p < 0,05$) по сравнению со здоровыми лицами (55,8 пг/мл). Через месяц после терапии препаратом на основе лизата *E. coli* отмечено резкое повышение уровня HNP1-3, превышающее значения нормативных показателей в 1,48 раза (82,9 пг/мл). Спустя еще месяц данный показатель был сопоставим с данными контрольной группы (здоровые женщины), и в течение последующих сроков наблюдения (6 мес.) уровень этого дефенсина еще оставался на уровне нормы.

Азурофильные гранулоциты нейтрофилов содержат человеческий нейтрофильный пептид (HNP)-1-4, который является высоко гомологичным [Baroncelli S. et al., 2007]. Три важные дефенсина человека (HNP1-3) являются уникальными для нейтрофилов и составляют около 99% от общего количества дефенсинов этих клеток.

Активация нейтрофилов ведет к быстрому высвобождению дефенсинов [Agratti C. et al., 2009]. Только один клеточный тип, нейтрофилы, может быть источником HNP1-3 в плазме или других биологических жидкостях организма при инфекции и воспалении [Keller M. et al., 2012]. В нормальной плазме наблюдается низкий уровень (от недетектируемого уровня до 50 — 100 нг/мл) HNP1-3, в то время как при септических состояниях его уровень может возрасти до 10 мг/мл и даже более [Ramma W. et al., 2012]. Как видно из наших исследований, изначально низкий уровень данного дефенсина может свидетельствовать о наличии хронического воспалительного процесса в организме женщин и характеризовать истощенные ресурсы нейтрофилов, тем самым, отражая несостоятельность системы врожденного звена иммунитета.

В наших исследованиях у больных до лечения содержание лактоферрина было снижено в 2,75 раза (75,8 пг/мл) по сравнению с контролем (208,57 пг/мл), что также свидетельствовало о низкой функциональной активности лейкоцитов у женщин с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей. Этот показатель после проведения курса лечения постепенно стал повышаться и только к 3 месяцу достиг уровня нормы. Однако через 5 месяцев он снова стал снижаться, и к 6 месяцу этот показатель был ниже показателей у здоровых лиц в 1,3 раза (150 пг/мл) ($p < 0,05$). При этом следует отметить, что уровень LF в эти сроки у пациенток все же был значимо выше уровня исходных значений (до лечения) в 2 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, у больных отмечался низкий уровень HNP1-3 и LF, свидетельствующий о наличие вялотекущего инфекционного процесса в организме с низкой функциональной активностью эффекторов врожденного иммунитета. Применение «Уро-Ваксома» приводило к нормализации данных показателей в сыворотке крови женщин.

Кроме указанных выше функций, лактоферрин играет ключевую роль в

поддержании кишечного микробаланса, тем самым, благоприятно влияя на желудочно-кишечный тракт. Лактоферрин секретируется в плазму нейтрофилами, и его содержание в плазме здоровых людей составляет около 190 — 500 пг/мл LF. Концентрация лактоферрина в плазме представляет собой положительное соотношение общего пула нейтрофилов и скорости их оборота. При воспалении лактоферрин высвобождается из вторичных гранул нейтрофилов во внеклеточную среду. Поэтому концентрация внеклеточного лактоферрина может быть использована в качестве индекса активации нейтрофилов [6].

Свойство лактоферрина связывать железо представляет важную антимикробную функцию [5]. Человеческий лактоферрин связывается с бактериальными продуктами при помощи своего высоко положительного заряженного аминокислотного остатка. При этом происходит гибель различных бактерий за счет индукции в них внутриклеточных изменений без влияния на проницаемость мембраны. Расщепление лактоферрина пепсином приводит к высвобождению лактоферрицина Н. Этот пептид обладает большей антимикробной активностью, чем его предшественник, и он может ингибировать классический, но не альтернативный путь комплемента [5].

Следующим этапом наших исследований явилось определение иммуноглобулинов в сыворотке крови больных с РИНМП. Около 40% молекул IgA обнаруживается внутри сосудов. IgA нейтрализует вирусные антигены и бактериальные токсины, и в виде агрегированных молекул они активируют комплемент по альтернативному пути. IgA является преобладающим иммуноглобулином секреторных жидкостей. Секреторный IgA (sIgA) обладает протективной активностью в отношении слизистых оболочек [4]. IgA не может проникнуть через плацентарный барьер и, следовательно, отсутствует в крови плода. Сывороточная концентрация IgA у детей достигают уровня взрослых к 12-летнему возрасту [3].

IgM (в 75 — 80%) встречается внутри сосудов. Молекулы IgM являются полиреактивными и продуцируются как первичная В-клеточная реакция в ответ на антигенное стимулирование. В течение В-клеточного онтогенеза мономерный IgM появляется как первый В-клеточный рецептор (sIgM) [9].

IgM молекулы связывают комплемент гораздо более эффективнее, чем IgG, и активнее усиливают фагоцитоз дополнительно к их агглютинирующим и преципитатным свойствам. Фетальный IgM начинает продуцироваться на 20 неделе беременности. Концентрации IgM более 0,2 г/л в пуповинной крови характерны для внутриутробного инфицирования. Концентрация IgM у новорожденных составляет лишь 10% от значений взрослых, но они повышаются ко второму году жизни [9].

В наших исследованиях сывороточный уровень IgA и IgM у здоровых людей соответственно составил 423 и 466,5 мкг/мл, у больных до лечения — 708 и 463 мкг/мл, при этом существенной разницы в показателях после применения бактериального лизата не происходило. На 6 месяцев наблюдения содержание IgA находилось в пределах 727 мкг/мл, а IgM — 473,8 мкг/мл. Таким образом, у больных с РИНМП уровень IgM и IgA оставался в пределах нормальных значений, и применение «Уро-Ваксома» не изменяло эти показатели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bessler W.G., vor dem Esche U., Zgaga-Griesz A. et al. Immunostimulatory properties of the bacterial extract OM-89 in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*. 2010, 60 (6): 324-329.
2. Breakey A.A., Hinde K., Vallengia C.R. et al. Illness in breastfeeding infants relates to concentra-

- tion of lacto
2015, 20 (1)
3. Brusca I. O
Chem. 2015
4. Gibbins H. I.
by mucin-m
5. Gupta I., S
lactoferrin h
tabolism. N
6. Hao J., War
for ANCA-i
7. Koning N.,
interaction
8. Lehmann F
bowel disea
9. Panda S., D
1; 194 (1): 1
10. Yamamoto
rative Croh

Контактная и
105064, Моск

© КОЛЛЕКТИВ А

В.Б.Полищук,
А.Д.Шмитько,
А.Г.Чучалин²,

СОСТОЯНИ ОЖИДАНИ

НИИ вакци

Цель. Оп
транспланта
сыворотках к
транспланта
кори проводи
«Вектор-Бест
лее 0,18 МЕ/л
противокоре
доверительн
(55,2%) был з
Была выявле
циентов (г=0
ранее гормон
транспланта
коровой инф
до или после

Журн. микро

Ключевые сл
к вирусу к

- tion of lactoferrin and secretory immunoglobulin A in mother's milk. *Evol. Med. Public. Health.* 2015, 20 (1): 21-31.
3. Brusca I. Overview of biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. *Adv. Clin. Chem.* 2015, 68: 1-55.
 4. Gibbins H.L, Proctor G.B., Yakubov G.E. et al. SIgA binding to mucosal surfaces is mediated by mucin-mucin interactions. *PLoS One.* 2015, 20; 10 (3): e0119677.
 5. Gupta I., Sehgal R., Kanwar R.K. et al. Nanocapsules loaded with iron-saturated bovine lactoferrin have antimicrobial therapeutic potential and maintain calcium, zinc and iron metabolism. *Nanomedicine (Lond).* 2014, 2: 1-26.
 6. Hao J., Wang C., Yuan J. et al. A pro-inflammatory role of C5L2 in C5a-primed neutrophils for ANCA-induced activation. *PLoS One.* 2013, 13; 8 (6): e66305.
 7. Koning N., Kessen S.F., Van Der Voorn J.P. et al. Human milk blocks DC-SIGN-pathogen interaction via MUC1. *Front. Immunol.* 2015, 13; 6: 112.
 8. Lehmann F.S., Burri E., Beglinger C. The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2015, 8 (1): 23-36.
 9. Panda S., Ding J.L. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 2015, 1; 194 (1): 13-20.
 10. Yamamoto T. The clinical value of faecal calprotectin and lactoferrin measurement in postoperative Crohn's disease. *United European Gastroenterol. J.* 2015, 3 (1): 5-10.

Поступила 20.01.16

Контактная информация: Ахматова Н.К., д.м.н.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

В.Б.Полищук¹, А.А.Рыжов¹, М.П.Костинов¹, О.О.Магаршак¹,
А.Д.Шмитько¹, И.В.Лукачев¹, Г.В.Васильева¹, Д.А.Благовидов¹,
А.Г.Чучалин², С.Н.Авдеев², Н.А.Карчевская²

СОСТОЯНИЕ ПРОТИВОКОРЕВОВОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ ЛИСТА ОЖИДАНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛЕГКИХ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²НИИ пульмонологии, Москва

Цель. Определение напряженности иммунитета к кори у пациентов листа ожидания трансплантации легких. **Материалы и методы.** Исследовали уровень IgG к вирусу кори в сыворотках крови 80 взрослых пациентов (средний возраст $35,8 \pm 11,4$ лет) листа ожидания трансплантации легких, ранее не болевших корью. Определение уровня IgG к вирусу кори проводили методом ИФА с использованием стандартного набора реагентов фирмы «Вектор-Бест» (ВектоКорь-IgG). **Результаты.** Защитный уровень IgG к вирусу кори (более 0,18 МЕ/мл) был зарегистрирован у 83,8% обследованных пациентов. Средний уровень противокоревых антител был в пределах защитных значений и составил 1,53 МЕ/мл (95% доверительный интервал 1,17 — 1,89). В большинстве проанализированных образцов (55,2%) был зарегистрирован средний уровень (от 1 до 5 МЕ/мл) противокоревых антител. Была выявлена положительная корреляция между значениями антител и возрастом пациентов ($r=0,43$). Не было выявлено зависимости между уровнем антител и проводимой ранее гормональной и цитостатической терапией. **Заключение.** Пациенты листа ожидания трансплантации солидных органов являются группой риска по развитию тяжелого течения коревой инфекции, что диктует необходимость проведения вакцинации в короткие сроки до или после постановки в лист ожидания.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 55—60

Ключевые слова: вакциноуправляемые инфекции, корь, трансплантация легких, антитела к вирусу кори, иммунокомпрометированные пациенты