

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 67



9–10'2022

Научно-практический журнал

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

«Антибиотики и химиотерапия» —
ежемесячный научно-практический
журнал
Основан в 1956 году

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

Нагатинская ул., д. 3а, Москва, 117105.
Тел.: 89254723038
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Зав. редакцией к. б. н. Л. Б. Смирнова
Корректор: Е. А. Крыкова
Перевод: О. С. Смирнова
Сайт: www.antibiotics-chemotherapy.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 89254723038
E-mail: gncajournal@yandex.ru
Л. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка через объединённый
каталог «Пресса России»
или через «Агентство «КнигаСервис»:
подписной индекс — Е71404

Журнал зарегистрирован
в Комитете РФ по печати
Рег. свид. № 0110694 от 25 мая 1993 г.

Установочный тираж 5000 экз.

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: октябрь 2022

Свободная цена

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 67

9–10'2022

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор

Чл. корр. РАН, профессор, д. м. н. Сидоренко С. В.

Зам. главного редактора

профессор, д. м. н. Яковлев С. В.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Профессор, д. м. н. Белобородов В. А.
Академик РАН, профессор, д. б. н. Говорун В. М.
Чл. корр. РАН, профессор, д. б. н. Ильина Е. Н.
Профессор, д. м. н. Климко Н. Н.
Профессор, д. м. н. Колбин А. С.
Профессор, д. м. н. Кочеровец В. И.
Академик РАН, профессор, д. м. н. Лобзин Ю. В.
Профессор, д. х. н. Олсуфьева Е. Н.
Д. б. н. Переверзева Э. Р.
Д. м. н. Припутневич Т. В.
Профессор, д. м. н. Руднов В. А.
Д. б. н. Садыкова В. С.
Академик РАН, профессор, д. м. н. Сычев Д. А.
Д. х. н. Тевяшова А. Н.
Профессор, д. х. н. Тишков В. Н.
Чл. корр. РАН, профессор, д. б. н. Тутельян А. В.
Профессор, д. м. н. Шляпников С. А.
Профессор РАН, д. х. н. Щекотихин А. Е.

Научные редакторы

К. м. н. Кузнецова С. М.
К. б. н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Зуева Л. П.
Богуш Т. А.	Клясова Г. А.
Васильев А. Н.	Ленёва И. А.
Волжанин В. М.	Митрохин С. Д.
Дмитриева Н. В.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Ших Е. В.

Founders:

Ministry of Health
of the Russian Federation

State Scientific Center for Antibiotics

«Antibiotiki i Khimioterapiya»
(«Antibiotics and Chemotherapy»)
Monthly Scientific
and Practical Journal

Founded in 1956

Editorial office address:

3a Nagatinskaya st., Moscow, 117105
Russia
Tel.: +7-925-472-30-38
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Head of the Editorial Office:
Ph. D. in Biology L. B. Smirnova
Proofreader: E. A. Krykova
Translator: Olga S. Smirnova
Website:
www.antibiotics-chemotherapy.ru

Advertising Department:

Tel.: 89254723038
E-mail: gncajournal@yandex.ru
L. I. Gusak

Publisher:

Izdatelstvo «OKI»



*Subscription through the united
catalogue «Pressa Rossii»
(«Russian Press») or through
«Agentstvo Kniga-Servis»
(«Book Service Agency»):
subscription index — E71404*

The journal is registered
with the Press Committee
of the Russian Federation
Registration certificate No. 0110694
dated May 25, 1993

Circulation: 5000 copies

Tipography:
ООО «Литера»

Release Date: october 2022
Free price

ISSN 0235-2990

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Volume 67

9–10'2022

MONTHLY JOURNAL

Editor-in-Chief

Corresponding member of the RAS,
Professor, D. Sc. in Medicine Sergey V. Sidorenko
Deputy Editor-in-chief
Professor, D. Sc. in Medicine Sergey V. Yakovlev

RESPONSIBLE FOR THE ISSUE

Dmitry Yu. Belousov

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Professor, D. Sc. in Medicine Vladimir A. Beloborodov
Academician of the RAS, Professor,
D. Sc. in Biology Vadim M. Govorun
Professor, D. Sc. in Biology Elena N. Ilyina
Professor, D. Sc. in Medicine Nikolay N. Klimko
Professor, D. Sc. in Medicine Alexey S. Kolbin
Professor, D. Sc. in Medicine Vladimir I. Kocherovets
Academician of the RAS, Professor,
D. Sc. in Medicine Yuriy Yu. Lobzin
Professor, D. Sc. in Chemistry Evgenia N. Olsufieva
D. Sc. in Biology Eleonora R. Pereverzeva
D. Sc. in Medicine Tatyana V. Priputnevich
Professor, D. Sc. in Medicine Vladimir A. Rudnov
D. Sc. in Biology Vera S. Sadykova
Academician of the RAS, Professor,
D. Sc. in Medicine Dmitry A. Sychev
D. Sc. in Chemistry Anna N. Tevyasheva
Professor, D. Sc. in Chemistry Vladimir N. Tishkov
Corresponding member of the RAS, Professor,
D. Sc. in Medicine Alexey V. Tutelyan
Professor, D. Sc. in Medicine Sergey A. Shlyapnikov
Professor, D. Sc. in Chemistry Andrey E. Shchekotikhin

Scientific Editors

Ph. D. in Medicine Svetlana M. Kuznetsova
Ph. D. in Biology Irina V. Belyavskaya

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Natalia N. Besednova	Lyudmila P. Zueva
Tatyana A. Bogush	Galina A. Klyasova
Andrey N. Vasiliev	Irina A. Leneva
Valeriy M. Volzhanin	Sergey D. Mitrokhin
Natalya V. Dmitrieva	Victor V. Tets
Yuliya A. Zakharova	Evgenia V. Shikh

**Журнал* цитируется в: Medline; Ind Chem;
Index Medicus; Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr;
Current Contents (Life Sciences)**

**Cited in: Medline; Ind Chem; Index Medicus;
Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr;
Current Contents (Life Sciences)**

Экспериментальные статьи

- Ефременкова О. В., Маланичева И. А., Васильева Б. Ф.,
Ефименко Т. А., Глухова А. А., Кисиль О. В.,
Демьянкова М. В., Семизаев Х. С., Габриэлян Н. И.
Индукция и стабилизация антибактериальной
активности у пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534
Пахомов Ю. Д., Блинкова Л. П.,
Абдуллаева А. М., Валитова Р. К.
Изучение динамики перехода в некультивируемое
состояние антибиотикоустойчивых клеток *Escherichia coli*
Гостев В. В., Сулян О. С., Калиногорская О. С., Попенко Л. Н.,
Круглов А. Н., Гордеева С. А., Нестерова Е. В.,
Гладин Д. П., Трофимова Н. Н., Чулкова П. С.,
Агеевец И. В., Агеевец В. А., Черненькая Т. В.
Сравнительная активность
липогликопептидных антибиотиков в отношении
грамположительных бактерий
Курсанова М. А., Криворутченко Ю. Л.,
Постникова О. Н., Андроновская И. Б.
Синергетическая комбинация амфотерицина В
и антисептика мирамистина может быть эффективной
в борьбе с лекарственно-устойчивыми изолятами
грибов рода *Candida*
Карташова Н. П., Иванова А. В., Глубокова Е. А.,
Фальинская И. Н., Поромов А. А., Ленева И. А.
Противовирусная активность комбинации
интерферона альфа-2b и таурина *in vitro*
в отношении вируса SARS-CoV-2
Гамалей С. Г., Шимица Г. Г., Цыпенкова Е. С.,
Симакова О. В., Скарнович М. О., Скарнович М. А.,
Шишкина Л. Н., Таранов О. С., Иванова О. С.,
Левагина Г. М., Даниленко Е. Д.
Изучение противовирусной активности
и фармакологической безопасности интраназальной
формы двуспиральной рибонуклеиновой кислоты
Логинова С. Я., Шукина В. Н., Савенко С. В.,
Борисевич С. В., Филлин К. Н.,
Берзин И. А., Гладких В. Д.
Противовирусная активность препарата
Мифлохин® в отношении COVID-19

В помощь практикующему врачу

- Муслимова О. В., Журавлева М. В., Демидова О. А.,
Городецкая Г. И., Шапченко А. В., Сокова Е. А.
Ретроспективный анализ эффективности стартовой
эмпирической антибактериальной терапии
внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста
в многопрофильном стационаре Москвы
Зайцев А. А., Макаревич А. М.
Антимикробная терапия и COVID-19 —
«великое противостояние»

Обзоры

- Захарова Ю. А., Акимкин В. Г., Никитина Е. В.,
Иващенко И. А., Болгарова Е. В.,
Александрова Е. В., Скрипковская С. М.
Современное состояние проблемы
капсульного типирования *Streptococcus pneumoniae*
Гриднева Г. И., Белов Б. С., Аронова Е. С.
Пневмоцистная пневмония
при ревматических заболеваниях:
вопросы профилактики

Некролог

- Памяти Б. Г. Андрюкова

Experimental Research

- 4 Efremenkova Olga V., Malanicheva Irina A., Vasileva Basilya F.,
Efimenko Tatiana A., Glukhova Alla A., Kisil Olga V.,
Demiankova Mariia V., Semizaev Hussein S., Gabrielyan Nina I.
Induction and Stabilization of Antibacterial Activity
in a *Bacillus subtilis* 534 Probiotic Strain
11 Pakhomov Yuri D., Blinkova Larisa P.,
Abdullaeva Asiat M., Valitova Rumiya K.
Study of Transitional Dynamics Towards the Non-Culturable
State of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Cells
18 Gostev Vladimir V., Sulian Ofeliia S., Kalinogorskaya Olga S.,
Popenko Lyubov N., Kruglov Alexander N., Gordееva Svetlana A.,
Nesterova Elena V., Gladin Dmitrii P., Trophimova Natalya N.,
Chulkova Polina S., Ageevets Irina V.,
Ageevets Vladimir A., Chernenkaya Tatyana V.
Comparative Activity of Lipoglycopeptide Antibiotics
Against Gram-Positive Bacteria
25 Kirsanova Marina A., Krivorutchenko Yuri L.,
Postnikova Olga N., Andronovskaya Irina B.
Synergistic Combination of Amphotericin B
and Antiseptic Miramistin May Be Effective
in the Fight Against Drug-Resistant Isolates
of *Candida* Fungi
35 Kartashova Nadezhda P., Ivanina Anna V., Glubkova Ekaterina A.,
Falyinskaya Irina N., Poromov Artem A., Leneva Irina A.
Antiviral Activity of Interferon Alpha-2b
and Taurine Combination Against
SARS-CoV-2 *in vitro*
42 Gamaley Svetlana G., Shimina Galina G., Tsyplenkova Elena S.,
Simakova Olga V., Skarnovich Maxim O., Skarnovich Maria A.,
Shishkina Larisa N., Taranov Oleg S., Ivanova Olga S.,
Levagina Galina M., Danilenko Elena D.
Study on Antiviral Activity and Pharmacological Safety
of Double-Stranded Ribonucleic Acid
for Intranasal Administration
49 Loginova Svetlana Ya., Shukina Veronika N., Savenko Sergej V.,
Borisevich Sergej V., Filin Konstantin N.,
Berzin Igor A., Gladkikh Vadim D.
Antiviral Activity of the Preparation
Meflokhin® Against COVID-19

Guidelines for Practitioners

- 55 Muslimova Olga V., Zhuravleva Marina V., Demidova Olga A.,
Gorodetskaya Galina I., Shapchenko Anna V., Sokova Elena A. Ret-
rospective Analysis of the Initial Empirical
Antibiotic Therapy Effectiveness for Community-Acquired
Pneumonia in Young Individuals in Moscow
Multidisciplinary Hospital
63 Zaytsev Andrey A., Makarevich Andrey M.
Antimicrobial Therapy and COVID-19 —
the «Great Confrontation»

Reviews

- 69 Zakharova Yuliya A., Akimkin Vasilii G., Nikitina Ekaterina V.,
Ivashchenko Ivan A., Bolgarova Ekaterina V.,
Aleksandrova Ekaterina V., Skripkovskaya Svetlana M.
Current State of the *Streptococcus pneumoniae*
Capsular Typing Problem
79 Gridneva Galina I., Belov Boris S., Aronova Evgenia S.
Pneumocystis Pneumonia
in Rheumatic Diseases:
Issues of Prevention

Obituary

- 90 In Memory of B. G. Andryukov

* Журнал входит в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и кандидата наук.

Индукция и стабилизация антибактериальной активности у пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534

*О. В. ЕФРЕМЕНКОВА¹, И. А. МАЛАНИЧЕВА¹, Б. Ф. ВАСИЛЬЕВА¹,
Т. А. ЕФИМЕНКО¹, А. А. ГЛУХОВА¹, О. В. КИСИЛЬ¹, М. В. ДЕМЬЯНКОВА^{1,2},
Х. С. СЕМИЗАЕВ¹, Н. И. ГАБРИЭЛЯН²

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

Induction and Stabilization of Antibacterial Activity in a *Bacillus subtilis* 534 Probiotic Strain

*OLGA V. EFREMENKOVA¹, IRINA A. MALANICHEVA¹, BASILYA F. VASILEVA¹,
TATIANA A. EFIMENKO¹, ALLA A. GLUKHOVA¹, OLGA V. KISIL¹,
MARIIA V. DEMIANKOVA^{1,2}, HUSSEIN S. SEMIZAEV¹, NINA I. GABRIELIAN²

¹ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

² Federal Research Centre of Transplantology and Artificial Organs named after academician V. I. Shumakov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Резюме

В основе лекарственного средства пробиотика споробактерина лежит штамм *Bacillus subtilis* 534, для которого было показано антимикробное действие в отношении многих бактерий как коллекционных штаммов, так и антибиотикорезистентных форм клинических изолятов патогенных бактерий и грибов. Рассматривая данный штамм в качестве продуцента антибиотиков, была проведена ступенчатая мутагенная обработка с целью получения варианта, стабильно на высоком уровне проявляющего определённую антибиотическую активность. За три ступени мутагенной обработки и отбора получен мутантный вариант, эффективно подавляющий рост патогенных стафилококков, в том числе метициллинорезистентного стафилококка (MRSA).

Ключевые слова: антибиотики; антибиотикорезистентность; пробиотики; споробактерин; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*

Для цитирования: Ефременкова О. В., Маланичева И. А., Васильева Б. Ф., Ефименко Т. А., Глухова А. А., Кисиль О. В., Демьянкова М. В., Семизаев Х. С., Габриэлян Н. И. Индукция и стабилизация антибактериальной активности у пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 9–10: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-4-10>.

Abstract

Medicinal probiotic Sporobacterin is based on the *Bacillus subtilis* 534 strain, which has been shown to have antimicrobial activity against many bacteria, both the collection strains and the antibiotic-resistant forms of clinical isolates of pathogenic bacteria and fungi. Considering this strain as an antibiotic producer, a step-by-step mutagenic treatment was carried out in order to obtain a variant that consistently exhibits a certain high-level antibiotic activity. A mutant variant was obtained during the three stages of mutagenic treatment and selection; it effectively suppresses the growth of pathogenic staphylococci, including methicillin-resistant staphylococcus (MRSA).

Keywords: antibiotics; antibiotic resistance; probiotics; sporobacterin; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*

For citation: Efremenkova O. V., Malanicheva I. A., Vasileva B. F., Efimenko T. A., Glukhova A. A., Kisil O. V., Demiankova M. V., Semizayev H. S., Gabrielyan N. I. Induction and stabilization of antibacterial activity in a *Bacillus subtilis* 534 probiotic strain. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-4-10>.

Введение

Пробиотики — это лекарственные средства, в основе которых лежат живые микроорганизмы,

способствующие нормализации микробиоты человека. Термин «пробиотик» также применяется непосредственно к самим пробиотическим мик-

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, г. Москва, Россия, 119021. E-mail: ovefr@yandex.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 11 bld 1 Bolshaya Pirogovskaya Street, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia. E-mail: ovefr@yandex.ru

роорганизмам. Действие пробиотиков носит многофакторный характер и одним из свойств пробиотиков является образование антибиотических веществ, способствующих восстановлению баланса микробиоты кишечника. Ценным свойством многих пробиотиков является отсутствие токсичности [1].

К пробиотическим микроорганизмам, применяемым в качестве лекарственных средств для нормализации микробиоты, преимущественно относятся *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Эти бактерии являются естественными компонентами кишечной микробиоты человека, а их применение способствует восстановлению баланса микробиоты, в частности после перенесённой антибиотикотерапии. Сенная палочка (*Bacillus subtilis*) также используется в качестве пробиотика [2–4]. Большинство бактерий рода *Bacillus*, включая *B. subtilis*, широко распространены в окружающей среде и не опасны для человека. Их обнаруживают в почве, воде, воздухе и пищевых продуктах, и, как следствие, они постоянно попадают в организм человека. Количество бацилл в кишечнике может достигать 10^7 КОЕ/г, что сравнимо с аналогичным показателем у *Lactobacillus*. Хотя *B. subtilis* относится к транзиторным пробиотикам, то есть временно присутствующим в организме человека, ряд исследователей рассматривают бактерии этого вида как один из доминирующих компонентов нормальной микрофлоры кишечника [2–4].

Механизм пробиотического действия бактерий может быть связан с синтезом противомикробных веществ, усилением неспецифического и специфического иммунитета, стимуляцией роста нормальной микрофлоры кишечника и выделением пищеварительных ферментов. У *B. subtilis* описано более ста антибиотиков, активных в отношении широкого спектра патогенных бактерий, вирусов и грибов. Эти соединения имеют различную химическую природу, в том числе описаны циклические липопептиды, поли- и олигопептиды, белки бактериоцины, разнообразие которых обуславливает широкий спектр активности антибиотиков данного продуцента [5–10]. Отмечено ценное свойство некоторых исследованных пробиотических штаммов *B. subtilis* — они обладают избирательным действием, вызывая гибель и подавление роста и размножения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, но нейтральны по отношению к микробиоте кишечника (лактобактериям, бифидобактериям, бактероидам и др.) [11].

Штамм *B. subtilis* 534 является основой пробиотического препарата споробактерина. Этот препарат представляет собой суспензию штамма *B. subtilis* 534 в 7% водном растворе хлорида натрия [12]. В России споробактерин успешно ис-

пользуется в течение последних тридцати лет, в частности, для профилактики и лечения послеоперационных бактериальных и грибковых инфекций в высокотехнологичной хирургии [12–14].

На сегодняшний день опубликованы результаты многолетних клинических и лабораторных исследований, согласно которым применение споробактерина в технологии раннего послеоперационного ведения пациентов с кардиохирургическим и трансплантационным профилями открывает возможности для оптимизации клинического состояния пациентов, а также значительно сокращает продолжительность курсов антибактериальной терапии [15–18]. Ранее нами было показано, что штамм *B. subtilis* 534 образует не менее 4 антибиотических соединений или групп соединений с разным спектром антимикробного действия, из которых одно предположительно является бактериоцином, а другое соединение, проявляющее антимикотическую активность, предположительно является триеном. Образующие соединения ценны тем, что преодолевают антибиотикорезистентность как тест-штаммов, так и клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. capitis* sbsp. *urealyticus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Prototheca* sp., *Trichosporon* sp. [19–22].

В связи с распространением антибиотикорезистентности в популяциях патогенных бактерий большое значение приобретает изыскание новых эффективных природных антибиотиков. В данной работе мы рассматривали штамм *B. subtilis* 534 в качестве продуцента антибиотиков. Поскольку проявление антимикробной активности у штамма 534 зависит от многих факторов, нестабильно и трудно поддаётся биотехнологическому регулированию, конкретной задачей была разработка условий для стабилизации процесса биосинтеза и повышения продуктивности образующих антимикробных соединений.

Материал и методы

Объекты исследования. Основным объектом исследования являлся штамм *Bacillus subtilis* 534, депонированный в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА» под номером ИНА 01122, а также полученные из него мутанты. Для определения антибиотической активности использовали следующие коллекционные тест-штаммы: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 (уровень устойчивости к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина > 400 мкг/мл), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (метициллинорезистентный штамм — MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. Клинические изоляты *S. capitis* sbsp. *urealyticus* 1133 и *S. epidermidis* 2624 выделены от контаминированных пациентов Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова.

Таблица 1. Значения антимикробной активности наиболее перспективных мутантов *B.subtilis* 534, отобранных после первой ступени обработки мутагеном

Table 1. Antimicrobial activity values of the most promising *B.subtilis* 534 mutants selected after the first stage of mutagen treatment

Исходный штамм 534 и его мутантные варианты	Зоны отсутствия роста тест-штаммов, мм				
	<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>L.mesenteroides</i> ВКПМ В-4177	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.cerevisiae</i> RIA 259
534 (контроль)	16±1,3	0	0	0	(30±4,1)
534 (контроль)	18±1,9	0	0	0	(27±2,9)
534-17	16±1,7	0	0	18±1,6	(30±3,1)
534-18	18±1,6	0	17±1,2	19±1,9	17 (34±2,7)*
534-25	17±1,7	0	19±1,4	16±1,3	14 (28±2,1)*
534-30	26±2,3	0	0	(17±1,7)	(30±3,8)
534-31	26±1,7	0	0	(17±1,3)	(30±2,7)
534-35	26±1,7	0	0	(20±2,1)	(>30±4,2)

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках указаны зоны угнетения роста тест-штамма; * — в случае двойных зон, то есть зоны подавления роста и большей по диаметру зоны угнетения роста, в скобках указана зона угнетения роста.

Note. Here and in Table 2: zones of growth inhibition of the test strain are indicated in brackets; * — in the case of double zones, i. e. a zone of growth inhibition and a larger zone of growth inhibition, the zone of growth inhibition is indicated in brackets.

Условия культивирования. Все микроорганизмы выращивали на модифицированной среде №2 Гаузе следующего состава (%): глюкоза — 1, пептон — 0,5, триптон — 0,3, хлорид натрия — 0,5, агар — 2,0, вода водопроводная, pH 7,2–7,4. Тест-штаммы выращивали в течение 1 суток при температуре 37°C, исключение составляли *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177 и *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259, которые выращивали при 28°C.

В условиях глубокого культивирования исходный пробиотический штамм *B.subtilis* 534 и полученные из него мутанты выращивали в колбах Эрленмейера на жидкой модифицированной среде №2 Гаузе (без агара) на качалке 200 об/мин при температуре 28°C. Объём среды составлял от 50 до 300 мл при объёме колбы 750 мл. Засев осуществляли споровой суспензией из расчёта 10⁸, 10⁷ или 10⁶ спор на 1 мл питательной среды. Колбы инкубировали в условиях аэрирования на качалке с 200 об/мин при 28°C в течение 42 часов.

Химический мутагенез штамма *B.subtilis* 534. Суспензию спор штамма *B.subtilis* 534 обрабатывали 1% водным раствором диметилмочевины (ДММ) в течение 0,5, 1, 2 и 4 ч с последующим высевом на среду №2 Гаузе. Отдельные колонии как основного типа, так и с морфологическими отличиями, отсеивали и в дальнейшем определяли их уровень продуктивности и антимикробный спектр в культуральной жидкости.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК мутантных штаммов *B.subtilis*. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК мутантов *B.subtilis* анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работе использовали универсальные праймеры 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1492r (TACGGYTACCTGTTCAGACTT). Режим проведения ПЦР: (1) 3 мин при 95°C, (2) 25 циклов с чередованием температурных интервалов 30 с — при 95°C, 30 с — при 51°C, 90 с — при 72°C, (3) 7 мин — при 72°C. Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле при напряжённости электрического поля 5 В/см. ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). Для определения последовательностей использовали базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>) и Ribosomal Database Project (<<http://www.cme.msu.edu>>).

Определение антибиотической активности осуществляли методом диффузии в агар. Для этого в лунки диаметром 9 мм в агаровой среде с высевом газона тест-штамма вносили по 100 мкл образцов культуральной жидкости. Через сутки инкубирования определяли диаметры зон задержки роста бактерий или дрожжей вокруг лунок, являющиеся показателем антибиотической активности исследуемых образцов.

Результаты и обсуждение

Для стабилизации и повышения уровня биосинтеза антимикробных соединений была получена серия мутантных вариантов из штамма *B.subtilis* 534 методом ступенчатого химического мутагенеза. На первой ступени мутагенеза было установлено, что при титре исходной суспензии 1,2×10⁹ выживаемость клеток уменьшалась в зависимости от времени экспозиции мутагеном и составляла 1,2×10⁵ и 1,6×10³ жизнеспособных клеток в 1 мл суспензии через 2 и 4 ч обработки, соответственно. При этих экспозициях были отобраны наиболее перспективные варианты — продуценты антимикробных веществ. Среди выросших колоний, наряду с колониями основного типа, наблюдались следующие морфологические отличия от исходного штамма *B.subtilis* 534: больший размер колонии, карликовая колония, интенсивность окраски колонии, матовость поверхности, форма края колонии, складчатость. После первой стадии мутагенеза с учётом морфологических отличий, отобрано 44 клона для определения антимикробной активности.

Для осуществления биосинтеза мутантными штаммами были выбраны условия, ранее определённые как оптимальные для биосинтеза антимикробных веществ исходным штаммом 534: объём среды в колбах 200 мл, нагрузка посевного материала 10⁷ клеток/мл среды, длительность культивирования 42 ч. Анализ антимикробной активности в культуральной жидкости проводили в отношении пяти тест-штаммов, уделяя основное внимание активности против устойчивых тест-штаммов (табл. 1).

Различия в характере проявляемой антимикробной активности у мутантов были видны уже на первой стадии анализа культуральной жидкости. Например, культуральная жидкость мутант-

Таблица 2. Значения антимикробной активности культуральной жидкости мутантного штамма *B.subtilis* 534-25 при разной нагрузке посевного материала

Table 2. Values of culture liquid antimicrobial activity of the mutant strain *B.subtilis* 534-25 at different inoculum loads

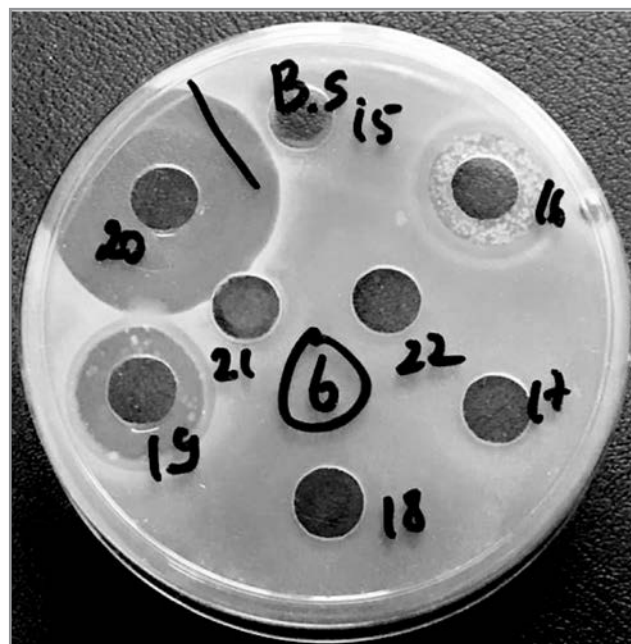
Нагрузка посевного материала (клеток/мл среды)	Диаметр зон задержки роста (мм)		
	<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>L.mesenteroides</i> ВКПМ В-4177	<i>S.cerevisiae</i> RIA 259
10^8	22±1,6 21±1,7	0 0	0 (22±2,1) 0 (20±1,7)
10^7	(20±1,7) (22±1,4)	11±0,7 12±1,1	11±0,4 (20±1,5) 12±0,9 (22±2,1)
10^6	(18±0,9) (20±1,1)	15±0,7 16±1,4	14±0,5 (20±1,6) 15±0,7 (20±1,9)

ных вариантов 16, 19 и 20 образует вокруг лунок зону диффузии антимикробных соединений, подавляющих рост тест-штамма *B.subtilis* ATCC 6633 (рисунок). На рисунке видно, что в популяции тест-штамма ATCC 6633 есть устойчивые клетки к антимикробному веществу варианта 19, рост которых виден в виде нескольких колоний на фоне зоны подавления роста, большое количество выросших устойчивых колоний вокруг лунки варианта 16 и отсутствие устойчивых форм вокруг лунки варианта 20; также видна стимуляция роста тест-штамма у перечисленных мутантов, которая проявляется в виде более плотного роста *B.subtilis* ATCC 6633 на границе зоны подавления роста (см. рисунок). Разная резистентность тест-штамма свидетельствует о биосинтезе данными мутантами разных антимикробных веществ.

Показатели антимикробной активности шести наиболее перспективных мутантов *B.subtilis* 534, полученных на первой стадии обработки ДММ, обобщены в табл. 1. В отличие от контрольных вариантов родительского штамма, мутантные варианты 30, 31 и 35 демонстрируют повышенную активность в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA), в то время как штаммы 18 и 25 подавляют рост ванкомицино-резистентного штамма *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177; варианты 17, 18 и 25 также проявляют активность в отношении грамотрицательной бактерии (*E.coli* ATCC 25922); варианты 18 и 25 отличаются от контрольных вариантов родительского штамма *B.subtilis* 534 и от других мутантов антимикотической активностью (в отношении пекарных дрожжей (*S.cerevisiae* RIA 259) (табл. 1).

Оптимальные показатели антимикробной активности продемонстрировал мутантный штамм *B.subtilis* 534-25 («534-25»), он был проверен в общей сложности 5 раз и после подтверждения стабильности биосинтеза выбран для второй стадии мутагенеза.

Была проанализирована антимикробная активность культуральной жидкости мутантного варианта 534-25 при разной нагрузке посевного материала в отношении тест-штамов *S.aureus* ИНА 00761, *S.cerevisiae* RIA 259 и *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177 в условиях погружённого культивирования (табл. 2). Полученные результаты поз-



Зоны подавления роста тест-штамма *B.subtilis* ATCC 6633 культуральной жидкостью мутантных вариантов штамма *B.subtilis* 534, полученных на первой ступени мутагенеза.

Zones of growth inhibition of the test strain *B.subtilis* ATCC 6633 by the culture liquid of mutant variants of the *B.subtilis* 534 strain obtained at the first stage of mutagenesis.

воляют предположить, что штамм 534-25 образует не менее 3 антибиотиков, образующихся поразному в ответ на разную нагрузку:

1. Уровень биосинтеза антибиотика (или антибиотиков), подавляющего рост MRSA, выше при наибольшей нагрузке посевного материала (10^8 клеток/мл среды).

2. Уровень биосинтеза антибиотика (или антибиотиков), подавляющего рост *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177 и дрожжей *S.cerevisiae* RIA 259, выше при снижении нагрузки посевного материала.

На второй и третьей стадии мутагенеза отбор мутантов проводили по уровню антимикробной активности культуральной жидкости, проявляемой в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA). На второй стадии мутагенеза было отсеяно 56 клонов, из которых мутантный вариант 534-25-21 превысил родительский мутантный вариант 534-25 на

Таблица 3. Значения антимикробной активности культуральной жидкости мутантного штамма *B.subtilis* 534-25-21-72 в отношении клинических изолятов *Staphylococcus* spp.

Table 3. The values of culture liquid antimicrobial activity of the mutant strain *B.subtilis* 534-25-21-72 against clinical isolates of *Staphylococcus* spp.

Клинические изоляты	Устойчивость клинических изолятов в отношении медицинских антибиотиков (всего использовано 22 антибиотика)	Зоны подавления роста под действием мутанта 534-25-21-72 (мм)
<i>S.capitis</i> sbsp. <i>urealyticus</i> 1133	2 (пенициллин и ампициллин)	22-24
<i>S.epidermidis</i> 2624	15 (ампициллин, амикацин, азтреонам, хлорамфеникол, клиндамицин, эритромицин, гентамицин, имипенем, левофлоксацин, меропенем, моксифлоксацин, тобрамицин, оксациллин, пенициллин, ампициллин/сульбактам, триметоприм/сульфаметоксазол, тетрациклин)	26-28

25%. Этот мутантный вариант также отличается от родительского по антимикробному спектру: из тест-бактерий активность проявляется только в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA), активность в отношении дрожжей *S.cerevisiae* RIA 259 проявляется в виде незначительной зоны угнетения роста (диаметр не более 16 мм).

На третьей стадии мутагенеза из варианта 534-25-21 было отсееено 74 клона. Главной задачей данной стадии было повышение уровня биосинтеза вещества (или веществ), подавляющих рост MRSA. По результатам анализа антимикробной активности был отобран мутант 534-25-21-72, у которого активность проявлялась только в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA), и зоны задержки роста составляли 25–28 мм при предварительном разведении культуральной жидкости в 100 раз.

Помимо коллекционного тест-штамма *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA) активность культуральной жидкости была дополнительно проверена в отношении двух клинических изолятов, устойчивых к ряду антибиотиков медицинского назначения (табл. 3).

Поскольку у бацилл не так много отличительных морфологических признаков, для подтверждения принадлежности мутантных вариантов 534-25, 534-25-21 и 534-25-21-72 к виду *B.subtilis* была проанализирована последовательность гена 16S rRNA и сопоставлена с последовательностью исходного штамма *B.subtilis* 534. Идентичность последовательности данного гена у исходного штамма и всех трёх мутантов подтверждает, что они происходят от штамма *B.subtilis* 534, а вызванные мутации не затрагивают ген 16S rRNA.

Обсуждение

Поиск новых природных антибиотиков основанно проводить среди микроорганизмов, являющихся компонентами сложных микробных сообществ, в которых признак антибиотикообразования выработан и закреплён эволюционно, поскольку он имеет важное значение в межвидовой конкуренции. К числу таких сообществ относится микробиота кишечника, в которой некото-

рые бактерии способны существовать длительное время или на постоянной основе, в том числе за счёт биосинтеза антибиотиков. К числу таких бактерий относится пробиотический штамм *B.subtilis* 534. Показано, что для любого штамма вида *B.subtilis* не менее 4–5% его генома предназначено для производства противомикробных соединений [6]. Ранее было показано, что штамм 534 проявляет антибиотическое действие в отношении широкого спектра бактерий и грибов. Сложности в разработке биотехнологий стабильного продуцирования соединений определённого антибиотического действия затрудняли работу по химическому изучению данного продуцента.

В настоящей работе стабилизировать биосинтез и также повысить уровень продуктивности удалось за счёт химического мутагенеза. Начиная со второй ступени мутагенеза, нами проводился отбор по активности в отношении резистентного стафилококка, однако возможно получение продуцента при отборе на ванкомицинорезистентный штамм или штамм дрожжей, для разработки антибиотиков, преодолевающих антибиотикорезистентность или обладающих антимикотическим действием, соответственно. Данный подход с применением химического мутагенеза не столько для повышения продуктивности, сколько для стабилизации процесса биосинтеза, рассматриваем как перспективный метод для разработки технологии получения антибиотиков бактериального происхождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (соглашение №075-15-2021-1345, Уникальный идентификатор проекта RF----193021X0012).

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest related to the publication of this article.

Литература/References

1. Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 2161–2171. doi: 10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004.
2. Скрыпник И.Н., Маслова А.С. Современные спорообразующие антибиотики в клинической практике. Современная гастроэнтерология. 2009; 3: 81–90. [Skrypnik I.N., Maslova A.S. Modern spore-forming probiotics in clinical practice. *Sovremennaya Gastroenterologiya.* 2009; 47 (3): 81–90. (in Russian)]
3. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. Химическая и биологическая безопасность. 2007; 2–3: 20–41. [Pokhilenko V.D., Pereygin V.V. Probiotics based on spore-forming bacteria and their safety. *Khim Biol Bezop.* 2007; 2–3: 20–41. (in Russian)]
4. Саустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis*. Актуальная инфектология. 2016; 2 (11): 35–44. [Saust'yanenko A.V. Mechanisms of action of probiotics based on *Bacillus subtilis*. *Aktual'naya Infektologiya.* 2016; 2 (11): 35–44. (in Russian)]
5. Fickers P. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? *Am J Biochem Biotech.* 2012; 8: 38–43. doi: 10.3844/AJBBS2012.38.43.
6. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005; 56 (4): 845–857. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
7. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 95–105. doi: 10.1038/nrmicro2937.
8. Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I.C., Nahm Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015; 61: 93–103. doi: 10.1139/cjm-2014-0613.
9. Efremenkova O.V., Gabrielyan N.I., Malanicheva I.A., Demiankova M.V., Efimenko T.A., Rogozhin E.A., Sharapchenko S.O., Krupeniy T.V., Davydov D., Kornilov M. Antibiotic properties of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 534. *International Archives of Medical Microbiology.* 2019; 2: 008. <https://doi.org/10.23937/10.23937/10.23937/1710008>.
10. Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. In: Vilas A.M. (ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Formatex, Badajoz, Spain. 2011; 1102–1111.
11. Тагиева С.А., Тахраманова Ф.Х. Преимущества применения бактерицидных препаратов по сравнению с химическими антибиотиками для лечения инфекций у человека и животных. (Обзор). Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020; 4: 122–128. [Tagieva S.A., Gakhramanova F.Kh. Advantages of the use of bacteriocins compared to chemical antibiotics for the treatment of infections in human and animals. (Review). *Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmaciya.* 2020; (4): 122–128. (in Russian)]
12. Никитенко В.И., Полякова В.С., Никитенко М.В., Симоненко Е.В., Бородин А.В., Копылов В.А., Фомина М.В. Препарат споробактерин. Новые данные о механизме действия этого и других живых бактериальных препаратов. Научный вестник Тюменской медицинской академии. 2001; 2: 70–72. [Nikitenko V.I., Polyakova V.S., Nikitenko M.V., Simonenko E.V., Borodin A.V., Kopylov V.A., Fomina M.V. Preparat sporobakterin. Novye dannye o mekhanizme dejstviya etogo i drugih zhivykh bakterial'nykh preparatov. *Nauchnyy vestnik Tyumenskoj medicinskoj akademii.* 2001; 2: 70–72. (in Russian)]
13. Патент СССР на изобретение № 1723116 А1/ 30.03.1992. Бюл. № 12. Никитенко В.И., Никитенко И.К. Бактериальный штамм *Bacillus subtilis*, используемый для получения препарата для профилактики и лечения воспалительных процессов и аллергических заболеваний. [Patent SU № 1723116 А1/ 30.03.1992. Byul. № 12. Nikitenko V.I., Nikitenko I.K. Bakterial'nyj shtamm *Bacillus subtilis*, ispol'zuemyj dlya polucheniya preparata dlya profilaktiki i lecheniya vospalitel'nyh processov i allergicheskix zaboolevanij. (in Russian)]. Доступно по: <https://patent.ru/patent/SU1723116A1>. Ссылка активна на 20.09.2022.
14. Патент РФ на изобретение № 2217154С2/ 27.11.2003 Бюл. № 33. Никитенко М.В., Никитенко В.И. Лекарственный препарат Споробактерин жидкий. [Patent RU № 2217154С2/ 27.11.2003 Byul. № 33. Nikitenko M.V., Nikitenko V.I. Lekarstvennyj preparat Sporobakterin zhidkij (in Russian)]. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2217154C2/ru>. Ссылка активна на 20.09.2022.
15. Габриэлян Н.И., Давыдов Д.С., Горская Е.М., Спирина Т.С., Осипова И.Г. Антагонизм *in vitro* споробактерина в отношении нозокомиальных штаммов бактерий. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2008; 6: 12–18. [Gabrielyan N.I., Davydov D.S., Gorskaya E.M., Spirina T.S., Osipova I.G. *In vitro* antagonism of sporobacterin against nosocomial strains of microbes. *Vestnik Transplantologii i Iskustvennyh Organov.* 2008; 6: 12–18. (in Russian)]
16. Казаков Э.Н., Габриэлян Н.И., Сенченко О.Р., Петраков К.В., Арефьева Л.И., Воронин Е.М. К вопросу о профилактике инфекционных осложнений после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения. Российский медицинский журнал. 2013; 2: 13–16. [Kazakov E.N., Gabrielyan N.I., Senchenko O.R., Petrakov K.V., Arefeva L.I., Voronin E.M. The clinical and economic issues of patient management after cardiac-surgery operations. *Rossiiskij Medicinskij Zhurnal.* 2013; 2: 13–16. (in Russian)]
17. Третьяков А.А., Стадников А.А., Вальшев А.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения споробактерина в комплексной терапии при механической желтухе. Анналы травматологии и ортопедии. 2001; 2: 42–48. [Tretyakov A.A., Stadnikov A.A., Valyshev A.V. Kliniko-eksperimental'noe obosnovanie primeneniya sporobakterina v kompleksnoj terapii pri mekhanicheskoj zheltuhe. *Annaly Travmatologii i Ortopedii.* 2001; 2: 42–48. (in Russian)]
18. Сорокина В.О., Минасов Б.Ш., Попова О.В., Попов О.С. Применение споробактерина в лечении пациентов с ожоговыми ранами. Медицинский вестник Башкортостана. 2013; 8 (6): 106–108. [Sorokina V.O., Minasov B.Sh., Popova O.V., Popov O.S. Sporobacterin in treatment of patients with burn wounds. *Medicinskij Vestnik Bashkortostana.* 2013; 8 (6): 106–108. (in Russian)]
19. Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Крупенин Т.В., Зенкова В.А., Ефименко Т.А., Маланicheva И.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С. Оценка антимикробной активности бациллярного пробиотика *Bacillus subtilis* (штамм 534). Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016; 1: 41–47. [Gabrielyan N.I., Gorskaya E.M., Krupeniy T.V., Zenkova V.A., Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Sumarukova I.G., Efremenkova O.V., Evlashkina V.F., Davydov D.S. Evaluation of the antimicrobial activity of the bacterial probiotic *Bacillus subtilis* 534. *Epidemiologiya i Infekcionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy.* 2016; 1: 41–47. (in Russian)]
20. Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И., Маланicheva И.А., Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Удалова В.В., Глухова А.А., Рогожин Е.А., Алферова В.А., Коришун В.А., Кубанова М.Х., Драбкина И.В., Крупенин Т.В. Антибиотическая активность пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534 в отношении клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*. Антибиотики и химиотерапия. 2016; 61 (9–10): 3–7. [Efremenkova O.V., Gabrielyan N.I., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Terekhova L.P., Udalova V.V., Gluhova A.A., Rogozhin E.A., Alferova V.A., Korshun V.A., Kubanova M.H., Drabkina I.V., Krupeniy T.V. Antibiotic activity of probiotic strain *Bacillus subtilis* 534 against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotiki i Khimioter.* 2016; 61 (9–10): 3–7. (in Russian)]
21. Габриэлян Н.И., Драбкина И.В., Крупенин Т.В., Демьянкова М.В., Маланicheva И.А., Васильева Б.Ф., Ефименко Т.А., Сумарукова И.Г., Глухова А.А., Бойкова Ю.В., Малкина Н.Д., Удалова В.В., Алферова В.А., Коришун В.А., Ефременкова О.В. Антимикотическая активность штамма *Bacillus subtilis* 534 — основы лекарственного препарата пробиотика споробактерина. Антибиотики и химиотерапия. 2017; 62 (11–12): 7–11. [Gabrielyan N.I., Drabkina I.V., Krupeniy T.V., Dem'yankova M.V., Malanicheva I.A., Vasil'eva B.F., Efimenko T.A., Sumarukova I.G., Gluhova A.A., Bojkova YU.V., Malkina N.D., Udalova V.V., Alfyorova V.A., Korshun V.A., Efremenkova O.V. Antimycotic activity of the *Bacillus subtilis* 534 strain — foundations of probiotic sporobacterin. *Antibiotiki i Khimioter.* 2017; 62 (11–12): 7–11. (in Russian)]
22. Маланicheva И.А., Кубанова М.Х., Алферова В.А., Коришун В.А., Драбкина И.В., Крупенин Т.В., Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И. Антимикробные свойства штамма *Bacillus subtilis* 534 — основы лекарственного препарата пробиотика споробактерина. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова, 2017, 13 (4): 59–65. [Malanicheva I.A., Kubanova M.H., Alferova V.A., Korshun V.A., Drabkina I.V., Krupeniy T.V., Efremenkova O.V., Gabrielyan N.I. Antimikrobnnye svoystva shtamma *Bacillus subtilis* 534 — osnovy lekarstvennogo preparata probiotika sporobakterina. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Himicheskoy Biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova,* 2017, 13 (4): 59–65. (in Russian)]

Информация об авторах

Ефременкова Ольга Владимировна — к. б. н., заведующая сектором поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-3131-1031. ResearcherID: AAB-3284-2022. eLIBRARY SPIN-код: 9342-5542. Scopus Author ID: 6603882213

Маланичева Ирина Алексеевна — к. б. н., старший научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-7623-6146. ResearcherID: AAD-1828-2022. eLIBRARY SPIN-код: 8314-0809. Scopus Author ID: 6602339599

Васильева Базиля Фейзуловна — научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9077-1965. Scopus Author ID: 57204061590

Ефименко Татьяна Александровна — к. б. н., старший научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9632-6854. ResearcherID: A-5085-2019. eLIBRARY SPIN-код: 8821-9617. Scopus Author ID: 56403188800

Глухова Алла Алексеевна — научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0561-4709. Scopus Author ID: 57192180120

Кисиль Ольга Валерьевна — к. х. н., ученый секретарь Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4799-1318. ResearcherID: G-6580-2017. eLIBRARY SPIN-код: 1153-8414. Scopus Author ID: 36770374700

Демьянкова Мария Владимировна — младший научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0085-1668. ResearcherID: AAT-2514-2021. eLIBRARY SPIN-код: 2460-8399. Scopus Author ID: 57204364679

Семизаев Хусейн Султахметович — инженер сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия

Габриэлян Нина Индзаровна — д. м. н., заведующая отделом эндотоксикозов и гнойно-септических осложнений Национального медицинского исследовательского центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-1941-8311. eLIBRARY SPIN-код: 3334-9750. Scopus Author ID: 57218483603

About the authors

Olga V. Efremenkova — Ph. D. in Biology, Head of the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-3131-1031. ResearcherID: AAB-3284-2022. eLIBRARY SPIN: 9342-5542. Scopus Author ID: 6603882213

Irina A. Malanicheva — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-7623-6146. ResearcherID: AAD-1828-2022. eLIBRARY SPIN: 8314-0809. Scopus Author ID: 6602339599

Basilya F. Vasileva — Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9077-1965. Scopus Author ID: 57204061590

Tatiana A. Efimenko — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9632-6854. ResearcherID: A-5085-2019. eLIBRARY SPIN: 8821-9617. Scopus Author ID: 56403188800

Alla A. Glukhova — Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian. ORCID: 0000-0003-0561-4709. Scopus Author ID: 57192180120

Olga V. Kisel — Ph. D. in Chemistry, Scientific Secretary, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4799-1318. ResearcherID: G-6580-2017. eLIBRARY SPIN: 1153-8414. Scopus Author ID: 36770374700

Mariia V. Demiamkova — Junior Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-0085-1668. ResearcherID: AAT-2514-2021. eLIBRARY SPIN: 2460-8399. Scopus Author ID: 57204364679

Hussein S. Semizaev — Engineer at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Nina I. Gabrielyan — D. Sc. in medicine, Head of the Department of Endotoxemia and Purulent-Septic Complications, Federal Research Centre of Transplantology and Artificial Organs named after academician V. I. Shumakov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-1941-8311. eLIBRARY SPIN: 3334-9750. Scopus Author ID: 57218483603

Изучение динамики перехода в некультивируемое состояние антибиотикоустойчивых клеток *Escherichia coli*

*Ю. Д. ПАХОМОВ¹, Л. П. БЛИНКОВА¹, А. М. АБДУЛЛАЕВА², Р. К. ВАЛИТОВА¹

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

² Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Study of Transitional Dynamics Towards the Non-Culturable State of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Cells

*YURY D. PAKHOMOV¹, LARISA P. BLINKOVA¹,
ASIAT M. ABDULLAEVA², RUMIYA K. VALITOVA¹

¹ I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

² Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia

Резюме

Актуальность. Известно, что в ответ на присутствие антибиотиков бактерии вырабатывают устойчивость к их действию и стремятся сохранить её на длительный срок. Кроме того, микробы могут сохранять жизнеспособность, переходя в некультивируемое состояние, не выявляемое микробиологическими методами. Это состояние популяции характеризуется устойчивостью клеток к разным стрессам, в том числе к воздействию антибиотиков. **Цель.** Изучить параметры процесса перехода в некультивируемое состояние у клеток *Escherichia coli* M-17, устойчивых к антибиотикам.

Материал и методы. Резистентные клетки *E. coli* M17 получали культивированием исходной популяции в средах с повышающимися концентрациями ампициллина (до 50 мкг/мл). Из чувствительного и резистентного субштаммов готовили посевные культуры, из которых клетки переносили в гиперосмотическую, «голодную» среду — искусственную морскую воду. Полученные популяции инкубировали в течение длительного времени, периодически отбирая пробы для оценки параметров жизнеспособности.

Результаты. В опытах по длительной инкубации чувствительной и резистентной популяций *E. coli* M-17 обнаружено, что ампициллинорезистентный субштамм исследуемой культуры переходил в некультивируемое состояние достоверно быстрее и количественно больше, чем его чувствительный вариант. Присутствие антибиотика в посевной культуре (R2) увеличивало сроки перехода устойчивых бактерий в жизнеспособное некультивируемое состояние до уровня >90% по сравнению с посевной культурой без антибиотика (R1). В среде без антибиотика популяция R1 в начале стрессового воздействия массово (до 77,7%) переходила в жизнеспособные некультивируемые клетки. При наблюдении отмечены периоды отмирания клеток, которые становились субстратом для живой части популяции и могли приводить к вторичному росту бактерий или частичному восстановлению dormantных клеток.

Заключение. Клетки, резистентные к антибиотикам, быстрее переходили в некультивируемое состояние по сравнению с чувствительными клетками исследованного штамма. Добавление антибиотика в среду для получения посевной культуры замедляло переход клеток в некультивируемое состояние.

Ключевые слова: жизнеспособные некультивируемые клетки (ЖНК); *Escherichia coli*; антибиотик; чувствительность; резистентность; ампициллин

Для цитирования: Пахомов Ю. Д., Блинкова Л. П., Абдуллаева А. М., Валитова Р. К. Изучение динамики перехода в некультивируемое состояние антибиотикоустойчивых клеток *Escherichia coli*. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 11–17. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-11-17>.

Abstract

Background. It is known that bacteria develop resistance to antibiotics in response to their presence and tend to maintain it for a long time. In addition, microbes can remain viable by passing into an uncultivated state that is not detected by microbiological methods. This state of the population is characterized by cell resistance to various stresses, including the effects of antibiotics.

Aim. To study the parameters of transition into an uncultivated state in *E. coli* M-17 cells resistant to an antibiotic.

Material and methods. Resistant *E. coli* M-17 cells were obtained by culturing the initial population in media with increasing concentrations of ampicillin (up to 50 µg/mL). Seed cultures were prepared from sensitive and resistant substrains, from which the cells were transferred to a hyperosmotic, «starvation» medium — artificial sea water. The resulting populations were incubated for a long time, samples were periodically taken to conduct the assessment of viability parameters.

Results. The experiments on long-term incubation of sensitive and resistant populations of *E. coli* M-17 showed that ampicillin-resistant substrain of the studied culture transitioned into an uncultivated state significantly faster and quantitatively

higher than its sensitive variant. The presence of the antibiotic in the inoculum increased the time for the transition of resistant R2 bacteria to a viable uncultivated state to a level of >90% compared to R1. The R1 population at the beginning of the stress exposure massively (up to 77.7%) transitioned into viable but non-culturable cells (VBNCs) in the medium without an antibiotic in a similar seed culture. Periods of cell death were noted during the observation, with those cells becoming a substrate for the living part of the population and could lead to secondary growth of bacteria or partial restoration of dormant cells.

Conclusion. Cells resistant to the antibiotic quickly transitioned into the non-culturable state compared to sensitive cells of the studied strain. The addition of an antibiotic to the medium for obtaining a seed culture slowed down the transition of cells to an uncultivated state.

Keywords: *viable but non-culturable cells (VBNC); Escherichia coli; antibiotic; sensitivity; resistance; ampicillin*

For citation: Pakhomov Yu. D., Blinkova L. P., Abdullaeva A. M., Valitova R. K. Study of transitional dynamics towards the non-culturable state of antibiotic-resistant *Escherichia coli* cells. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 11–17. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-11-17>.

Введение

По информации Всемирной организации здравоохранения, устойчивость бактерий к антибиотикам представляет собой постоянную угрозу для здоровья человека и общественной безопасности, которая снижает эффективность борьбы с лекарственно-резистентными инфекциями [1]. По оценкам учёных, до 2020 г. инфекции, вызванные антибиотикорезистентными микроорганизмами, приводили к смерти 700 000 человек во всём мире [2]. Заболевания, которые вызывают возбудители, устойчивые к антибиотикам, вследствие этого становится всё сложнее лечить, а уровень смертности увеличивается, особенно от бактериальных инфекций, вызванных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [3, 4]. Предполагается, что к 2050 г. бактериальная устойчивость к антибиотикам будет вызывать около 10 млн смертей во всём мире в год, и превысит количество летальных случаев, связанных с раком [5].

В соответствии с этой тенденцией роста смертности ВОЗ и Центры по контролю и профилактике заболеваний США полагают, что устойчивость к антибиотикам может обусловить глобальный кризис в здравоохранении, поскольку распространённые заболевания, как например, диарея бактериальной этиологии, могут переходить в тяжёлые состояния [6]. Антибиотики оказали существенное влияние на сохранение здоровья человеческой популяции, но их постоянное применение создаёт экономические проблемы [7]. Так, как только патоген подвергается воздействию новых лекарственных соединений, он начинает адаптироваться, разрабатывая способы противодействия их атаке. Следовательно, продолжительность применения антибиотика и потенциальный доход фармацевтических компаний снижаются [7].

Вероятно, целесообразно тратить значительно больше времени и усилий на поиск способов предотвращения дальнейшего распространения антибиотикоустойчивости, механизм формиро-

вания которой разнообразен [8]. Поэтому изучение поведения популяций антибиотикоустойчивых микробов, переходящих в состояние жизнеспособных некультивируемых клеток (ЖНК), представляет научный интерес.

В последние годы появились сообщения, что бактериальный покой является вероятным путём приобретения и сохранения спорными бактериями резистентности к антибиотикам [9, 10]. Жизнеспособные, но некультивируемые клетки микроорганизмов исследователи считают типичным спящим состоянием части популяций. Переход в состояние ЖНК считается важной стратегической реакцией для выживаемости бактерий в ответ на стрессы окружающей среды. В этом состоянии бактерии не могут расти на обычных питательных средах, но они остаются жизнеспособными и могут восстанавливать культивируемость при благоприятных условиях [11–17]. В связи с этим у специалистов возникли сомнения по поводу того, могут ли обычные и новые технологии дезинфекции полностью устранить патогены, поскольку из-за характерной для ЖНК устойчивости бактерий они не могут быть полностью уничтожены традиционными методами обеззараживания. Это приводит к возникновению у бактерий потенциального риска обмена генами резистентности к антибиотикам. После пребывания микроорганизма в состоянии ЖНК, индуцированного у бактерий, устойчивых к антибиотикам, и восстановления у клеток пролиферации может происходить горизонтальный перенос генов при определённых условиях [15].

Показано, что возможность и скорость перехода в некультивируемое состояние зависят от свойств штамма [16, 17], также на эти процессы влияют условия предынкубации культуры [18] микроорганизма, в том числе в средах, содержащих высокие дозы антибиотиков [19].

Цель работы — изучение влияния предсуществующей у бактериальных клеток антибиотикорезистентности на динамику процесса образования жизнеспособных некультивируемых клеток *Escherichia coli*.

Таблица 1. Показатели жизнеспособности клеток популяции *E.coli* M17 (исходный штамм S1), чувствительных к ампициллину

Table 1. Cell viability of the *E.coli* M17 population (original strain S1) sensitive to ampicillin

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (S1)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток $\times 10^7/\text{мл}$, $X \pm m$	10^7 КОЕ/мл, $X \pm m$	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	12,4 $\pm$ 1,36	1,6 $\pm$ 0,18	100	0	87,1
6	3,25 $\pm$ 0,36	1,76 $\pm$ 0,19	100	0	45,8
13	3,59 $\pm$ 0,36	13,1 $\pm$ 3,24	100	0	0
20	3,8 $\pm$ 0,27	2,63 $\pm$ 0,29	100	0	30,8
27	3,05 $\pm$ 0,34	1,83 $\pm$ 0,20	100	0	40,0
48	2,67 $\pm$ 0,29	1,89 $\pm$ 0,21	100	0	29,2
55	1,19 $\pm$ 0,13	2,06 $\pm$ 0,23	100	0	0
69	1,06 $\pm$ 0,12	2,25 $\pm$ 0,25	74,0	26,0	0
90	1,33 $\pm$ 0,15	1,63 $\pm$ 0,18	100	0	0
97	0,893 $\pm$ 0,098	0,659 $\pm$ 0,072	91,0	9,0	18,9
104	2,72 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,4	81,0	19,0	0
111	3,130 $\pm$ 0,344	2,75 $\pm$ 0,303	73,0	27,0	0
132	3,35 $\pm$ 0,37	0,335 $\pm$ 0,037	58,9	41,1	83,0
139	2,75 $\pm$ 0,30	0,0189 $\pm$ 0,0013	70,0	30,0	99,0
146	2,55 $\pm$ 0,28	0,0966 $\pm$ 0,011	100	0	96,2
153	2,2 $\pm$ 0,24	0,0918 $\pm$ 0,01	56,0	44,0	92,5
223	2,18 $\pm$ 0,24	0,22 $\pm$ 0,0242	52,8	47,2	80,9
238	2,66 $\pm$ 0,29	0,207 $\pm$ 0,023	100	0	92,2
252	1,38 $\pm$ 0,15	0,092 $\pm$ 0,01	69,0	31,0	90,3
259	2,81 $\pm$ 0,31	0,183 $\pm$ 0,02	23,9	66,1	72,7
273	0,61 $\pm$ 0,067	0,158 $\pm$ 0,017	54,0	46,0	52

Материал и методы

В работе использован штамм *E.coli* M-17. Для создания антибиотикорезистентности у *E.coli* M-17 популяцию культивировали на 1,5% питательном агаре в среде со ступенчато повышающейся концентрацией (2,5; 5; 10; 25 и 50 мг/мл) ампициллина (ОАО «Синтез»). Устойчивые к ампициллину бактериальные клетки, выросшие на чашке с 50 мкг/мл, использовали для выращивания посевной культуры и для дальнейшего получения ЖНК. При изучении особенностей формирования ЖНК в опытах с отсутствием «давления антибиотического стресса» посевную культуру с ранее полученными антибиотикоустойчивыми бактериями выращивали без ампициллина (субпопуляция R1) или готовили с 25 мкг ампициллина (субпопуляция R2). В экспериментах с антибиотикорезистентными бактериями антибиотикочувствительные клетки исходного штамма (S1 и S2) являлись контролем.

При получении посевных культур клетки выращивали в питательном бульоне в течение 18 ч, затем их концентрировали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 8 мин. Сливали супернатант, отмывали и ресуспендировали клетки в физиологическом растворе. Затем их переносили во флаконы с искусственной безбелковой и безуглеводной морской водой, создавая стрессовые условия (осмотический и трофический стрессы). Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение длительного срока (6 и 9 мес.).

Периодически отбирали пробы для определения общей численности клеток, высеваемости бактерий по числу колониеобразующих единиц (КОЕ/мл), количества живых и мёртвых клеток, процента ЖНК. Общее число клеток подсчитывали в счётной камере Горяева. Число КОЕ/мл определяли в чашках с 1,5% питательным агаром, а долю живых и мёртвых клеток в популяции определяли в люминесцентном микроскопе после окрашивания набором ДНК-тропных красителей Live/DeadTM (США). Для этого клетки концентрировали центрифугированием (10 мин при 13000 об/мин) до значений 10^8 клеток/мл, затем к 100 мкл полученного концентрата при-

ливали 3,0 мкл рабочего раствора красителя (рабочий раствор готовили путём десятикратного разведения дистиллированной водой смеси красителей, селективно окрашивающих живые и мёртвые клетки). Полученный препарат инкубировали в темноте в течение 15 мин, затем просматривали в люминесцентном микроскопе Opton при увеличении $\times 320$. Поля зрения фотографировали, архивировали на компьютере и подсчитывали число зелёных (живых) и красных (мёртвых) клеток, затем определяли их процентное соотношение. На основании совокупности всех данных определяли количество ЖНК. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием параметрических критериев (определение $\bar{X}$, s, m) для уровня достоверности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Наблюдения за популяциями клеток *E.coli* M17 в состоянии ЖНК, находившихся в условиях стресса, были проведены нами в течение продолжительного периода и отличавшихся такими ключевыми свойствами культур, как антибиотикорезистентность и антибиотикочувствительность. В экспериментах изучали динамику параметров жизнеспособности, культивируемости и перехода в некультивируемое состояние у клеток *E.coli* M17 ампициллинорезистентных субштаммов (R1 и R2) и ампициллиночувствительных (S1 и S2).

В табл. 1 и 2 представлены средние значения динамического изменения количественных показателей общего числа бактерий (антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных к 50 мкг/мл ампициллина), численности выросших на питательном агаре колониеобразующих единиц в 1 мл популяции *E.coli* M-17, а также живых,

Таблица 2. Показатели жизнеспособности клеток популяции *E.coli* M17 (субштамм R1), резистентных к 50 мкг/мл ампициллина

Table 2. Cell viability of *E.coli* M17 (substrain R1) resistant to 50 µg/ml ampicillin

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (S1)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток $\times 10^7$ /мл, $X \pm m$	10^7 КОЕ/мл, $X \pm m$	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	54,8±6,03	12,2±1,34	100	0	77,7
6	42,4±4,66	28,5±3,14	100	0	32,8
13	49,2±5,41	13,3±1,46	100	0	73,0
20	48±5,28	2,98±0,33	100	0	93,8
27	36±3,96	2,3±0,25	79,0	21,0	91,9
48	8,47±0,93	2,68±0,29	83,0	17,0	61,9
55	5,12±0,56	2,37±0,26	100	0	53,7
62	5,98±0,66	1,44±0,16	50,0	50,0	51,8
69	1,36±0,15	1,37±0,15	92,0	8,0	0
90	4,61±0,57	0,41±0,045	100	0	91,1
97	7,23±0,79	0,734±0,0807	79,0	21,0	87,1
104	6,14±0,67	0,859±0,0944	89,0	11,0	84,3
111	6,81±0,75	0,172±0,019	73,4	24,6	96,6
132	6,24±0,69	0,326±0,0359	58,8	41,2	91,1
139	9,04±1,00	0,0275±0,0030	85,0	15,0	99,6
146	7,91±0,87	0,0266±0,0029	88,0	12,0	99,6
153	6,24±0,69	0,039±0,00429	66,0	34,0	99,1
230	3,74±0,41	0,17±0,0187	93,0	7,0	95,1
238	6,77±0,74	0,122±0,013	100	0	98,2
252	5,33±0,59	0,166±0,018	83,8	16,2	96,3
259	9,59±1,05	0,248±0,027	62,7	37,3	95,9
273	8,55±0,94	0,405±0,045	80,6	19,4	94,1

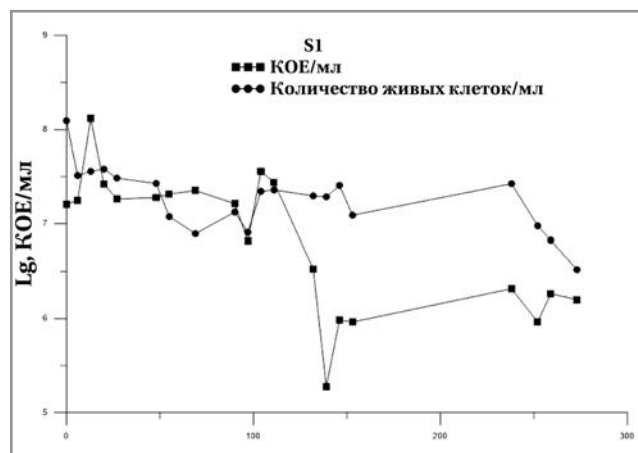


Рис. 1. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, чувствительной к ампициллину (исходный штамм S1)

Fig. 1. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, sensitive to ampicillin (original strain S1)

мёртвых и жизнеспособных, но некультивируемых бактерий.

Как следует из табл. 1, средняя численность общего количества ампициллиночувствительных бактерий с первоначального показателя $(12,4 \pm 1,36) \times 10^7$ кл/мл к 273-му дню (9 мес.) наблюдения от начала экспериментов статистически значимо ($p < 0,05$) снизилось до $(0,61 \pm 0,067) \times 10^7$ /мл,

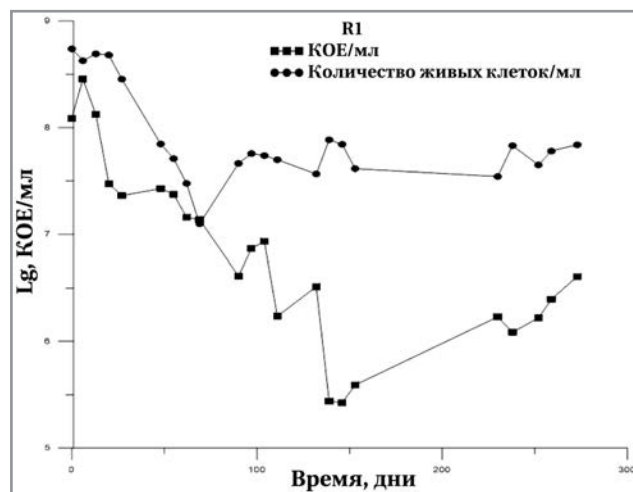


Рис. 2. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, устойчивой к 50 мкг/мл ампициллина (суб-штамм R1)

Fig. 2. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, resistant to 50 µg / ml of ampicillin (sub-strain R1)

т. е. в 20,3 раза. Исходное количество КОЕ/мл к последнему дню наблюдения уменьшилось на 1 порядок. Флуктуационные изменения изученных показателей для популяций S1 и R1 в течение 9 мес. хорошо видны на рис. 1 и 2. Гибель микроорганизмов, которые становились питательным субстратом для оставшихся живых клеток приводила к крат-

Таблица 3. Показатели жизнеспособности клеток популяции штамма *E.coli* M17 (исходный штамм S2, чувствительный к ампициллину)

Table 3. Cell viability of the *E.coli* M17 population (original strain S2 sensitive to ampicillin)

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (R2)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток $\times 10^7/\text{мл}$, $X \pm m$	10^7 КОЕ/мл, $X \pm m$	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	2,85±0,31	4±0,44	100	0	0
6	2,66±0,29	9,38±1,03	100	0	0
13	2,49±0,27	1,64±0,18	100	0	34,1
20	2,53±0,28	2,12±0,23	100	0	16,2
41	3,87±0,43	1,75±0,19	72,0	28,0	37,2
48	0,38±0,041	1,41±0,16	79,0	21,0	0
62	1,01±0,11	0,589±0,065	61,0	39,0	4,39
83	2,00±0,22	0,68±0,075	57,0	43,0	40,4
90	1,03±0,11	0,81±0,089	43,0	57,0	0
97	1,64±0,18	1,91±0,21	76,0	24,0	0
104	2,64±0,29	1,38±0,15	37,7	62,7	0
132	1,94±0,21	0,272±0,023	65,0	35,0	78,4
139	1,07±0,12	0,0744±0,0082	53,0	47,0	86,9
146	1,49±0,16	0,0883±0,0097	27,0	73,0	79,3
223	1,73±0,19	0,0544±0,00598	51,4	48,6	93,9
231	1,59±0,17	0,0248±0,0027	100	0	98,44
245	2,37±0,26	0,026±0,0029	41,5	58,5	97,35
252	2,87±0,32	0,031±0,0034	50,0	50,0	78,39

ковременному подъёму уровня микробов. Амплитуда таких колебаний постоянно сокращалась. Это отражалось на процентном показателе ЖНК бактерий, который увеличивался от 0 до 99%.

Определение тех же показателей у антибиотикорезистентного субштамма R1 в аналогичные сроки выявило меньший уровень различий ($p < 0,05$) между точкой 0 и 9 мес. (с $54,8 \pm 6,03 \times 10^7$ кл/мл до $(8,55 \pm 0,94) \times 10^7$ кл/мл, т. е. в 6,4 раза (табл. 2, рис. 2). Численность КОЕ/мл в этот интервал времени понизилась в 30 раз ($p < 0,05$). Сравнение указанных показателей для культур *E.coli* M-17 S1 и R1 показало, что процент образовавшихся ЖНК в популяции ампициллиночувствительного штамма S1 постоянно варьировал до 4,5 мес. (132 сут), после чего реверсии ЖНК клеток к культурабельности не наблюдали. Величина присутствовавших в этой S1-популяции ЖНК составляла 52–99%, тогда как для ампициллинорезистентных бактерий R1 устойчивое образование ЖНК в значительных количествах установлено через 2 нед. (13 сут) от начала эксперимента с колебаниями в статистически незначимых ($p > 0,05$) пределах (73; 93,8; 91,9; 61,9; 53,7% и т. д.).

Показано, что при высеве популяций R1 и R2 на чашки с питательным агаром, в которые был добавлен ампициллин в дозе 50 мкг/мл не выявлено статистически достоверных различий ($p > 0,05$) в количестве КОЕ/мл, по сравнению с высевом этих популяций на среду без антибиотика (рис. 3, 4). Из этого следует, что в период наблюдений за переходом клеток *E.coli* M17 в состоянии ЖНК признак резистентности к антибиотикам не терялся со временем. Вероятно, ранний переход

антибиотикорезистентных эшерихий в некультивируемое состояние с момента начала опыта, может быть связан с генетически регулируемой памятью на перенесённый антибиотический стресс («антибиотическое давление») [13]. Клетки в такой ситуации, видимо, вырабатывали механизм быстрого перехода в ЖНК, т. е. бактерии в присутствии антибиотика стремились сохранить такой приобретённый уровень резистентности через переход в ЖНК. Это, вероятно, позволит им успешно адаптироваться и повысить показатель антибиотикорезистентности в условиях более высокой концентрации вещества.

Следует также рассмотреть результаты, полученные в связи с особенностью выращивания посевной культуры, которое осуществляли без добавления антибиотика в среду (S1 и S2). Эксперименты, проведённые с теми же культурами *E.coli* M17 (обозначение S2 и R2) и посевной культурой, которую выращивали в питательном бульоне с антибиотиком, выявили однотипную стратегию формирования ЖНК у ампициллиночувствительных (S1 и S2). Так, стабильное образование ЖНК (табл. 1, 3) у антибиотикочувствительного штамма S2 начиналось так же, как у S1, с 132 суток. У популяции R2 (табл. 3, 4) стабильный уровень ЖНК появился раньше, чем у S2 (с 83 сут, а не со 132 сут, т. е. опережение почти на 2 мес.). По-видимому, «полезное» для возбудителя свойство устойчивости к губительным концентрациям антибиотика, которое также выявляется к любым стрессам благодаря механизму перехода в ЖНК, микроорганизмы стремятся сохранить.

Таблица 4. Показатели жизнеспособности клеток популяции *E.coli* M17 (субштамм R2, устойчивый к 50 мкг/мл ампициллина)

Table 4. Cell viability of the *E.coli* M17 population (R2 substrain resistant to 50 µg/ml ampicillin)

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (R2)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток ×10 ⁷ /мл, <i>X±m</i>	10 ⁷ КОЕ/мл, <i>X±m</i>	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	3,05±0,34	6,54±0,72	38,0	62,0	0
6	3,93±0,43	1,28±0,14	100	0	67,4
13	3,96±0,44	2,9±0,32	90,0	10,0	18,6
20	2,79±0,31	3±0,33	75,0	25,0	0
48	1,65±0,18	2,26±0,25	80,0	20,0	0
62	1,57±0,17	1,29±0,14	60,0	40,0	0
83	1±0,11	0,515±0,057	57,0	43,0	9,64
90	1,38±0,15	0,599±0.066	100	0	56,59
104	1,95±0,21	0,781±0,086	45,6	54,4	12,2
125	3,03±0,33	0,433±0,048	64,5	35,5	77,8
132	2,73±0,30	0,211±0,023	67,0	33,0	88,5
139	2,61±0,28	0,124±0,014	77,0	23,0	93,8
146	0,907±0,01	0,115±0,013	60,0	40,0	78,9
223	3,27±0,36	0,318±0,035	70,0	30,0	86,1
230	2,62±0,29	0,201±0,022	100	0	92,3
244	4,6±0,51	0,238±0,026	74,4	25,6	93,04
252	4,31±0,47	0,194±0,021	55,8	44,2	91,9

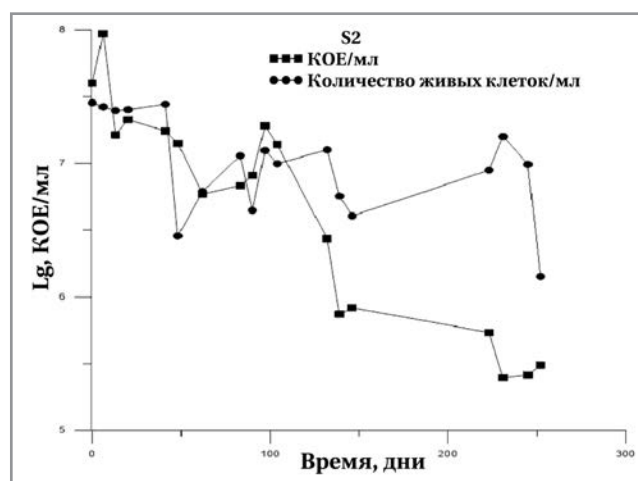


Рис. 3. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, чувствительной к ампициллину (исходный штамм S2)

Fig. 3. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, sensitive to ampicillin (original strain S2)

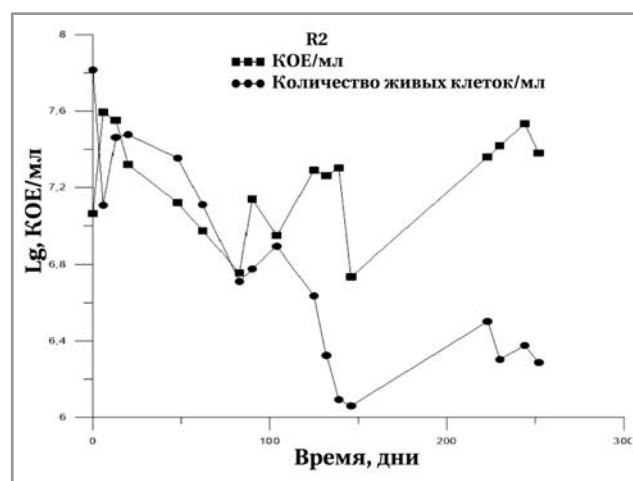


Рис. 4. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, резистентной к 50 мкг/мл ампициллина (субштамм R2)

Fig. 4. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, resistant to 50 µg/ml of ampicillin (sub-strain R2)

Закключение

Нами показано, что устойчивые к ампициллину клетки (R1 и R2) быстрее и более сбалансированно, чем чувствительные (S1 и S2), достигали максимальных показателей образования ЖНК под воздействием осмотического и трофического стрессов при выращивании посевной культуры

без антибиотика. Присутствие антибиотика в посевной культуре увеличивало сроки перехода в жизнеспособное некультивируемое состояние устойчивых бактерий R2 по сравнению с R1 без антибиотика до уровня выше 90%. В среде без антибиотика в аналогичной посевной культуре популяция R1 в начале стрессового воздействия массово (до 77,7%) переходила в ЖНК.

Литература/References

1. WHO. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. World Health Organization, 2020.
2. Cai Y., Jianying L., Guiying L., Keung P., An W. T. Formation mechanisms of viable but nonculturable bacteria through induction by light-based disinfection and their antibiotic resistance gene transfer risk: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1932397>.
3. Chang P. H., Juhrend B., Olson T. M., Marrs C. F., Wigginton K. R. Degradation of extracellular antibiotic resistance genes with UV254 treatment. *Environmental Science & Technology*, 2017; 51 (11): 6185–6192. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01120>
4. Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*, 2015; 109 (7): 309–318. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
5. Band V. I., Hufnagel D. A., Jaggavarapu S., Sherman E. X., Wozniak J. E., Satola S. W. et al. Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. *Nat Microbiol*, 2019; 4 (10): 1627–1635. doi: 10.1038/s41564-019-0480-z.
6. Liu, Y.-Y. Wang Y., Walsh T. R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2016; 16 (2): 161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
7. McKenna M. The antibiotic paradox: Why companies can't afford to create life-saving drugs. *Nature*, 2020; 584 (7821): 338–341. doi: 10.1038/d41586-020-02418-x.
8. Peterson E. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front microbiol*, 2018; 9: 2928. doi: 10.3389/fmicb.2018.02928. eCollection 2018.
9. Reineke K., Mathys A. Endospore inactivation by emerging technologies: A review of target structures and inactivation mechanisms. *Ann Rev Food Sci Technol*, 2020; 11 (1): 255–274. doi: 10.1146/annurev-food-032519-051632.
10. Wormer L., Hoshino T., Bowles M. W., Viehweger B., Adhikari R. R., Xiao N. Microbial dormancy in the marine subsurface: Global endospore abundance and response to burial. *Sci Adv*, 2019; 5 (2): eaav1024. doi: 10.1126/sciadv.aav1024.
11. Pakhomov Yu. D., Blinkova L. P., Dmitrieva O. V., Berdyugina O. S., Skorlupkina N. N. Factors for conversion of nonculturable probiotic bacteria into active state. *Journal of Nature Science and Sustainable Technology*, 2016; 10 (1): 147–153.
12. Pakhomov Yu. D., Blinkova L. P., Abdullaeva A. M., Valitova R. K., Karachina T. A. Induction and resuscitation of viable but nonculturable bacteria from different taxonomic groups. *Gorteria Journal*, 2020; 34 (4): 229–235.
13. Bodor A., Boundedjoum N., Vincze G. E., Kis A. E., Laczi K., Bende G. et al. Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 2020; 19 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>.
14. Dong K., Pan H., Yang D., Rao L., Zhao L., Wang Y. et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020; 19 (1): 149–183. doi: 10.1111/1541-4337.12513.
15. Fu Y., Jia Y., Fan J., Yu C., Shen C. Induction of *Escherichia coli* O157: H7 into a viable but non-culturable state by high temperature and its resuscitation. *Environ Microbiol Rep*, 2020; 12 (5): 568–577. doi: 10.1111/1758-2229.12877.
16. Masuda Y., Tajima K., Ezura Y. Resuscitation of *Tenacibaculum* sp., the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* from viable but non-culturable state. *Fisheries Science*, 2004; 70 (2): 277–284.
17. Карачина Т.А., Блинкова Л.П., Абдуллаева А.М., Валитова Р.К., Пахомов Ю.Д. Действие фагов на бактерии в некультивируемом состоянии. Проблемы медицинской микологии. 2021; 23 (2): 85–86. [Karachina T. A., Blinkova L. P., Abdullaeva A. M., Valitova R. K., Pakhomov Yu. D. Effects of phages on bacteria in nonculturable state. *Problemy Meditsinskoi Mikologii*, 2021; 23 (2): 85–86. (in Russian)]
18. Skorlupkina N., Blinkova L., Pakhomov Yu., Piyadina A., Chistaykova D. Formation and reversion of VBNC cells of *Salmonella* Typhimurium preincubated in different substrates. *International Journal of Current Research and Review*, 2017; 9 (9): 20–25.
19. Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J. D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *J Bacteriol*, 2018; 200 (20): e00249–18. doi: 10.1128/JB.00249-18.

Информация об авторах

Пахомов Юрий Дмитриевич — к. б. н., старший научный сотрудник Федерального Государственного Научного Учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Блинкова Лариса Петровна — д. б. н., профессор, заведующий лабораторией микробиологических питательных сред Федерального Государственного Научного Учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Абдуллаева Асият Мухтаровна — д. б. н., профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы Московского Государственного университета пищевых производств, Москва, Россия

Валитова Румия Камилевна — младший научный сотрудник Федерального Государственного Научного Учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

About the authors

Yury D. Pakhomov — PhD in biology, senior researcher at FSBSI I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Larisa P. Blinkova — D.Sc. in biology, professor, head of the laboratory of microbiological nutrient media at FSBSI I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Asiat M. Abdullaeva — D.Sc. in biology, professor of the chair of veterinary examination at Moscow State University of Food Industry, Moscow, Russia

Rumiya K. Valitova — junior researcher at FSBSI I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Сравнительная активность липогликопептидных антибиотиков в отношении грамположительных бактерий

*В. В. ГОСТЕВ^{1,2}, О. С. СУЛЯН¹, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ¹, Л. Н. ПОПЕНКО³,
А. Н. КРУГЛОВ⁴, С. А. ГОРДЕЕВА⁵, Е. В. НЕСТЕРОВА⁶, Д. П. ГЛАДИН⁷,
Н. Н. ТРОФИМОВА⁶, П. С. ЧУЛКОВА¹, И. В. АГЕЕВЕЦ¹,
В. А. АГЕЕВЕЦ¹, Т. В. ЧЕРНЕНКАЯ⁸

¹ ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБУ Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» ДЗМ, Москва, Россия

⁵ СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С. П. Боткина», Санкт-Петербург, Россия

⁶ СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер», Санкт-Петербург, Россия

⁷ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁸ ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского ДЗМ», Москва, Россия

Comparative Activity of Lipoglycopeptide Antibiotics Against Gram-Positive Bacteria

*VLADIMIR V. GOSTEV^{1,2}, OFELIA S. SULIAN¹, OLGA S. KALINOGORSKAYA¹,
LYUBOV N. POPENKO³, ALEXANDER N. KRUGLOV⁴, SVETLANA A. GORDEEVA⁵,
ELENA V. NESTEROVA⁶, DMITRII P. GLADIN⁷, NATALYA N. TROPHIMOVA⁶,
POLINA S. CHULKOVA¹, IRINA V. AGEEVETS¹, VLADIMIR A. AGEEVETS¹,
TATYANA V. CHERNENKAYA⁸

¹ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia

² North-Western State Medical University Named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

³ St. Petersburg I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, Saint Petersburg, Russia

⁴ Moscow Multidisciplinary Clinical Center «Kommunarka», Moscow, Russia

⁵ Clinical Infectious Diseases Hospital named after S.P. Botkin, Saint Petersburg, Russia

⁶ City Skin and Venereal Diseases Dispensary, Saint Petersburg, Russia

⁷ St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

⁸ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

Резюме

Липогликопептидные антибиотики являются полусинтетическими производными гликопептидов и характеризуются выраженной бактерицидной активностью в отношении грамположительных патогенов. Цель исследования — сравнительная оценка чувствительности грамположительных клинических изолятов к липогликопептидным антибиотикам (телаванцину, далбаванцину, оритаванцину). В работу были включены следующие изоляты: метициллинорезистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA, $n=780$), метициллинорезистентные коагулазоотрицательные *Staphylococcus* spp. (MRCoNS, $n=163$), и ванкомицинорезистентные *Enterococcus faecium* (VREf, $n=93$). Для оценки чувствительности использовали серийные разведения с добавлением в среду 0,002% полисорбата 80. Липогликопептиды проявляли более выраженную антибактериальную активность в отношении MRSA, по сравнению с ванкомицином, тейкопланином и даптомицином, и имели МПК₅₀/МПК₉₀ (мкг/мл): для телаванцина — 0,06/0,125, далбаванцина — 0,016/0,06, и оритаванцина — 0,06/0,125. Была установлена тенденция к увеличению МПК липогликопептидов и даптомицина у MRSA с МПК ванкомицина 2 мкг/мл, доля которых составила 13%. Для MRCoNS МПК₅₀ и МПК₉₀ липогликопептидов не превышали 0,06 мкг/мл и 0,125 мкг/мл, соответственно. Оритавагин проявлял выраженную активность в отношении VREf с диапазоном МПК от 0,03 мкг/мл до 0,5 мкг/мл при МПК₉₀ 0,25 мкг/мл. Таким образом, липогликопептидные антибиотики являются альтернативой ванкомицину и даптомицину, характеризуются выраженной активностью и могут использоваться для лечения тяжелых форм стафилококковых инфекций.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*; MRSA; стафилококки; энтерококки; чувствительность; ванкомицин; телаванцин; оритавагин; далбаванцин; тейкопланин; даптомицин

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул Профессора Попова,
д. 9, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022.
E-mail: guestvv11@gmail.com

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 9 Professora Popova st., St. Petersburg,
197022 Russian Federation. E-mail: guestvv11@gmail.com

Для цитирования: Гостев В. В., Сулян О. С., Калиногорская О. С., Попенко Л. Н., Круглов А. Н., Гордеева С. А., Нестерова Е. В., Гладин Д. П., Трофимова Н. Н., Чулкова П. С., Агеев И. В., Агеев В. А., Черненко Т. В. Сравнительная активность липогликопептидных антибиотиков в отношении грамположительных бактерий. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 18–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-18-24>.

Abstract

Lipoglycopeptide antibiotics are semi-synthetic derivatives of glycopeptides and are characterized by a pronounced bactericidal activity against gram-positive pathogens. The aim of the study was comparative assessment of the sensitivity of gram-positive clinical isolates to lipoglycopeptide antibiotics (telavancin, dalbavancin, oritavancin). The following isolates were included in the work: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, $n=780$), methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (MRCoNS, $n=163$), and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREf, $n=93$). Serial dilutions were used to assess sensitivity with the addition of 0.002% polysorbate 80 to the medium. Lipoglycopeptides showed more pronounced antibacterial activity against MRSA compared to vancomycin, teicoplanin, and daptomycin, and had a MIC₅₀/MIC₉₀ (μg/ml): for telavancin — 0.06 / 0.125, for dalbavancin — 0.016 / 0.06, and for oritavancin — 0.06 / 0.125. A trend towards an increase in the MIC of lipoglycopeptides and daptomycin was established in MRSA with the MIC of 2 μg/ml for vancomycin, the proportion of which was 13%. For MRCoNS, MIC₅₀ and MIC₉₀ of lipoglycopeptides did not exceed 0.06 μg/ml and 0.125 μg/ml, respectively. Oritavancin showed strong activity against VREf at MIC range of 0.03 μg/ml to 0.5 μg/ml, and at MIC₉₀ of 0.25 μg/ml. Thus, lipoglycopeptide antibiotics are a plausible alternative to vancomycin and daptomycin; they are characterized by pronounced activity and can be used to treat severe forms of staphylococcal infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; MRSA; staphylococci; enterococci; sensitivity; vancomycin; telavancin; oritavancin; dalbavancin; teicoplanin; daptomycin

For citation: Gostev V. V., Sulyan O. S., Kalinogorskaya O. S., Popenko L. N., Kruglov A. N., Gordeeva S. A., Nesterova E. V., Gladin D. P., Trofimova N. N., Chulkova P. S., Ageevets I. V., Ageevets V. A., Chernenkaya T. V. Comparative activity of lipoglycopeptide antibiotics against gram-positive bacteria. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 9–10: 18–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-18-24>.

Введение

Липогликопептидные антибиотики являются полусинтетическими производными гликопептидов и характеризуются выраженной бактерицидной активностью в отношении *Staphylococcus* spp., включая метициллинорезистентные *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) и *Streptococcus* spp. Первый представитель этой группы — тейкопланин был внедрён в клиническую практику ещё в конце 1980-х годов. Телаванцин, далбаванцин и оритаванцин — производные, соответственно, от ванкомицина, соединения A40926, хлорэремомицина, были внедрены в клиническую практику в последнее десятилетие [1]. Новые липогликопептиды демонстрируют гораздо более выраженную антибактериальную активность, по сравнению с ванкомицином, за счёт наличия нескольких механизмов действия. К их числу относятся: взаимодействие с терминальными остатками dALA-dALA в мономере — предшественнике пептидогликана (lipid II) в периплазматическом пространстве, что стабильно блокирует транспептидазную и трансгликозилазную реакции пенициллинсвязывающих белков. При этом новые липогликопептиды слабо взаимодействуют со свободными остатками dALA-dALA в самой структуре пептидогликана в отличие от ванкомицина, что является преимуществом. Второй механизм связан с наличием липофильного остатка в структуре молекулы антибиотиков, который взаимодействует с цитоплазматической мембраной с последующей димеризацией, что схоже с механизмом действия даптомицина [2–4]. Новые

липогликопептиды, как и тейкопланин, проявляют *in vitro* активность в отношении ванкомицинорезистентных vanB-положительных энтерококков. Это связано с тем, что молекулы антибиотиков не взаимодействуют с сенсорным белком и таким образом не индуцируют экспрессию *vanB* гена [4]. Оритаванцин демонстрирует *in vitro* активность в отношении и *vanA*-положительных энтерококков, поскольку связывается непосредственно с пептидным мостиком, независимо от состава терминальных остатков в структуре пептидогликанового мономера [5]. На сегодняшний день новые липогликопептиды являются альтернативой для лечения осложнённых форм стафилококковых инфекций, однако пока рекомендованы для лечения инфекций кожи и мягких тканей. Тем не менее, в ряде работ было показано, что липогликопептиды эффективны для терапии остеомиелитов [6], бактериемий и эндокардитов [7, 8]. Целью исследования стала сравнительная оценка чувствительности коллекции клинических грамположительных изолятов, циркулирующих в России, к липогликопептидным антибиотикам.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. В исследование включена коллекция неповторяющихся клинических изолятов стафилококков и энтерококков, включающая следующие группы. Это группа MRSA ($n=780$), включая внутрибольничные MRSA, выделенные от больных с разными формами стафилококковых инфекций (HA-MRSA, $n=575$), а также выделенные из зева и носоглотки здоровых носителей (CA-MRSA, $n=205$). Метициллинорезистентные коагулазоотрицательные стафилококки (MRCoNS, $n=163$), включающие следующие виды: *S. epi-*

dermidis (n=96), *S.hominis* (n=35), *S.haemolyticus* (n=32). Ванкомицинорезистентные *Enterococcus faecium* (VREf, n=93). Все метициллинорезистентные стафилококки были положительны по *mecA* гену и характеризовались устойчивостью к цефокситину. Коллекция микроорганизмов была собрана в 2011–2020 гг. из 30 центров в 11 городах России. В ДНКЦИБ изоляты депонированы в музей культур и хранились при –70°C в среде с 30% глицерина. Реидентификацию восстановленных суточных культур, выращенных на кровяном агаре проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT с использованием программного обеспечения Biotyper («Bruker Daltonics», Германия).

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) методом серийных разведений. Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений с определением МПК в бульоне Mueller-Hinton («Bio-Rad», Франция) в соответствии со стандартом ISO 20776-1:2019. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с EUCAST (версия 12.0, 2022) и CLSI (версия M100-Ed32, 2022) [9]. Были использованы следующие субстанции антибиотиков: ванкомицин, даптомицин («Molecula», Великобритания), тейкопланин, телаванцин, оритавагин, далбаванцин («Biosynth Carbosynth», Великобритания). Для определения чувствительности к даптомицину в среду был добавлен CaCl_2 в конечной концентрации 50 мг/л. Для определения чувствительности к липогликопептидам в среду был добавлен Tween®80 (P80) («Sigma-Aldrich», Германия) в конечной концентрации 0,002%. В качестве контрольных культур были использованы *S.aureus* ATCC 29213 и *S.aureus* Mu50 (ATCC 700699).

Анализ и статистическая обработка данных. Для обработки результатов МПК использовали платформу WHONET 2020 (версия 20.17.5). Рассчитывали следующие параметры: распределение и диапазон МПК, МПК₅₀, МПК₉₀, средняя геометрическая МПК (МПК_Г).

Результаты и обсуждение

Влияние содержания P80 в среде на чувствительность к антибиотикам. Анализ влияния разной концентрации P80 показал, что отсутствие P80 в среде в значительной степени повышает МПК ко всем липогликопептидам. Так, для ATCC 29213 значения МПК в серии повторов были в диапазоне от 0,125 мкг/мл до 1 мкг/мл ко всем трём антибиотикам; для ATCC 700699 значения МПК составили от 2 мкг/мл до ≥ 4 мкг/мл. При добавлении P80 в концентрациях, близких к рекомендованным (0,001–0,01%), МПК штамма ATCC 29213 находилась в пределах допустимых границ: $\leq 0,016$ –0,06 мкг/мл; МПК штамма ATCC 700699 была в пределах 0,25–1 мкг/мл. Добавка P80 в конечной концентрации 0,002% в среде необходима для предотвращения неспецифической адсорбции антибиотиков на поверхности пластика и является критичной для определения чувствительности к липогликопептидам, используя метод серийных разведений [10]. Стоит также отметить, что на уровень адсорбции (и на уровень МПК) при использовании P80 влияет и использование разных полистироловых 96-луночных планшетов, что было продемонстрировано в работе A. Kavanagh и соавт. [11].

Активность *in vitro* в отношении MRSA. Результаты оценки чувствительности к липоглико-

пептидным антибиотикам представлены в таблице. Липогликопептиды проявляли более выраженную антибактериальную активность в отношении MRSA по сравнению с ванкомицином, тейкопланином и даптомицином. Так, МПК₉₀ ванкомицина и тейкопланина в отношении MRSA составляла 2 мкг/мл, даптомицина — 1 мкг/мл, а для липогликопептидов этот показатель не превышал 0,125 мкг/мл. В группах изолятов, относящихся к HA-MRSA и CA-MRSA наблюдали аналогичные результаты. Среди MRSA 3,2 и 8,4% изолятов характеризовались пограничными значениями МПК — 0,25 мкг/мл к телаванцину и оритавагину, соответственно. Такие изоляты с пограничными значениями МПК характеризовались разной чувствительностью к ванкомицину, тейкопланину и даптомицину. Такой эффект возможно связан с особенностями использования P80 и разных 96-луночных планшетов, что ранее отмечалось в работах [10, 11]. Для далбаванцина 1% изолятов характеризовались МПК 0,25 мкг/мл, что по критериям CLSI является зоной чувствительности.

В целом, полученные в настоящем исследовании результаты, совпадают с международными исследованиями чувствительности стафилококков к липогликопептидным антибиотикам, где МПК₉₀ не превышает 0,125 мкг/мл для оритавагина, телаванцина и далбаванцина [12–14]. Среди HA-MRSA и CA-MRSA изолятов 15 и 7%, соответственно, характеризовались сниженной чувствительностью к ванкомицину (МПК 2 мкг/мл), общая доля изолятов MRSA с МПК ванкомицина 2 мкг/мл составила 13%. Используя значения параметра МПК_Г (мкг/мл), была проведена оценка зависимости между значениями МПК ванкомицина и другими антибиотиками. Так, была установлена тенденция к увеличению МПК липогликопептидов, а также даптомицина по мере увеличения МПК ванкомицина. Значение МПК_Г оритавагина, далбаванцина, телаванцина и даптомицина было в 1,5 раза выше у изолятов с МПК ванкомицина 2 мкг/мл, по сравнению с изолятами, имеющими МПК ≤ 1 мкг/мл (рисунок). По результатам оценки чувствительности в разных исследованиях отмечается, что изоляты со сниженной чувствительностью к ванкомицину (vancomycin intermediate *S.aureus*, VISA) характеризуются устойчивостью и к липогликопептидам [2, 15]. В ряде работ отмечается также формирование перекрёстной устойчивости между ванкомицином, даптомицином и липогликопептидами на фоне лечения этими антибиотиками [16, 17].

Активность *in vitro* в отношении MRCoNS. Изоляты MRCoNS характеризовались высокими значениями МПК к тейкопланину, так МПК₅₀ и МПК₉₀ составили 4 и 16 мкг/мл, соответственно (см. таблицу). Используемые протоколы EUCAST и CLSI различаются в отношении границ чувствительности, так критерии CLSI устанавливают

Оценка чувствительности *Staphylococcus* spp., *E. faecium* (VREF) к липопептидам
Evaluation of the sensitivity of *Staphylococcus* spp. and *E. faecium* (VREF) to lipoglycopeptides

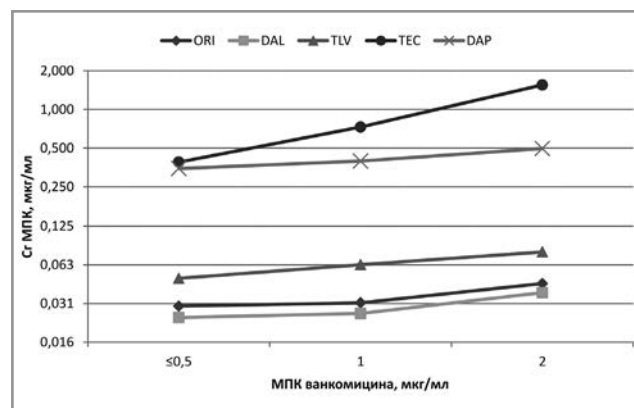
AB ^a	Распределение МПК (%), мкг/мл										МПК, мкг/мл				EUCAST ^b				CLSI ^c			
	≤0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	>16	МПК ₅₀	МПК ₉₀	C _t ^d	≤S	≥R	≤S	I	≥R			
MRSA (n=780)	VAN			1,4	22,2	62,3	13,4	0,4				1	2	0,93	2	4	2	4—8	16			
	TEC		0,1	4,3	13,4	30,2	35,9	13,2	3			1	2	0,70	2	4	8	16	32			
	TIV	21,4	0,1	40,4	34,8	3,2						0,06	0,125	0,06	0,125	0,25	0,125					
	DAL	51,0	25,8	16,1	6,1	1,0						0,016	0,06	0,03	0,125	0,25	0,25					
	ORI	48,5	20,7	22,4	8,4							0,06	0,125	0,04	0,125	0,25	0,125					
	DAP		5,7	4,9	23,5	50,9	13,4	1,3				0,5	1	0,40	1	2	1					
HA—MRSA (n=575)	VAN			0,4	16,5	66,6	15,6	0,7				1	2	0,99	2	4	2	4—8	16			
	TEC			2,0	8,9	28,9	40,6	16,1	3,5			1	2	0,82	2	4	8	16	32			
	TIV		17,0	39,9	39,5	3,5						0,06	0,125	0,07	0,125	0,25	0,125					
	DAL	47,5	27,8	16,5	7,0	1,1						0,03	0,06	0,03	0,125	0,25	0,25					
	ORI	51,6	0,2	18,7	21,5	8,0						0,016	0,125	0,04	0,125	0,25	0,125					
	DAP		2,0	3,7	22,9	54,1	15,6	1,4	0,4			0,5	1	0,45	1	2	1					
CA—MRSA (n=205)	VAN			4,4	38,0	50,2	7,3					1	1	0,76	2	4	2	4—8	16			
	TEC		0,5	11,0	26,0	34,0	22,5	5,0	1,0			0,5	1	0,45	2	4	8	16	32			
	TIV	33,5	0,5	41,9	21,7	2,5						0,06	0,125	0,05	0,125	0,25	0,125					
	DAL	60,8	20,1	14,7	3,4	1,0						0,016	0,06	0,02	0,125	0,25	0,25					
	ORI	36,8	27,8	25,7	9,7							0,06	0,125	0,05	0,125	0,25	0,125					
	DAP		16,5	8,5	25,6	41,5	6,8	1,1				0,25	0,5	0,28	1	2	1					
MRCoNS (n=163)	VAN			1,8	25,2	55,8	17,2					2	4	1,8	4	8	4	8—16	32			
	TEC		2,5	8,0	8,0	15,3	13,5	23,3	16,6	12,9		4	16	2,5	4	8	8	16	32			
	TIV	28,2	0,6	28,8	33,1	9,2						0,06	0,125	0,06								
	DAL	66,3	12,9	11,7	7,4	1,2	0,6					0,016	0,06	0,02	0,125	0,25						
	ORI	70,6	9,2	11,0	5,5	3,7						0,03	0,125	0,05								
	DAP		1,8	12,9	38,0	38,7	8,0	0,6				0,25	0,5	0,33	1	2	1					
VREF (n=93)	TEC			5,4	3,2					2,2	89,2	>32	>32	72	2	4	8	16	32			
	TIV	3,2	1,1	2,2		2,2	4,3				87,1	>16	>16	2,8			0,25					
	DAL	6,5		1,1		1,1					91,4	>16	>16	1,48			0,25					
	ORI	54,8	18,3	16,1	8,6	2,2						0,03	0,25	0,05			0,125					
	DAP		2,2	1,1	3,2	12,9	31,2	38,7	10,8			2	8	2,45			4		8 ^e			

Примечание. ^a — сокращения антибиотиков (AB): VAN — ванкомицин; TEC — тейкопланин; TIV — телаванцин; DAL — далбаванцин; ORI — оригаванцин; DAP — даптомицин. ^b — EUCAST — версия протокола 2022, v.12.0. ^c — CLSI — версия протокола M100-Ed32 (2022). ^d — C_t — средняя геометрическая МПК. ^e — критерии представлены для *E. faecium*. Глубокая серая заливка соответствует значениям, которые выходят за пределы чувствительности по критериям EUCAST и/или CLSI. **Note.** ^a — antibiotic abbreviations (AB): VAN — vancomycin; TEC — teicoplanin; TIV — telavancin; DAL — dalbavancin; ORI — oritavancin; DAP — daptomycin; ^b — EUCAST — protocol version 2022, v.12.0; ^c — CLSI — protocol version M100-Ed32 (2022); ^d — C_t — geometric mean of MIC; Eriteria are presented for *E. faecium*. Deep gray shading corresponds to values that are outside the sensitivity limits of the EUCAST and/or CLSI criteria.

максимальное пограничное значение для коагулазоотрицательных стафилококков в 32 мкг/мл. Один изолят *S.epidermidis* характеризовался сниженной чувствительностью к даптомицину с МПК 2 мкг/мл. Клинические пограничные точки, как и эпидемиологические точки отсечения (ECOFF), для липогликопептидов в отношении коагулазоотрицательных стафилококков пока не разработаны (за исключением далбаванцина, по критериям EUCAST). Тем не менее, несмотря на высокие значения МПК к ванкомицину и тейкопланину, характер распределения МПК липогликопептидов был аналогичен распределению у MRSA, и МПК₅₀/МПК₉₀ не превышало 0,06 мкг/мл и 0,125 мкг/мл, соответственно. Исследования чувствительности MRCoNS к липогликопептидам изучено в меньшей степени, однако имеющиеся результаты демонстрируют их высокую *in vitro* активность, и МПК₉₀ не превышает 0,125 мкг/мл [14, 18]. Также описаны клинические примеры успешного применения липогликопептидов для лечения инфекций, вызванных MRCoNS [19, 20].

Активность *in vitro* в отношении ванкомицинорезистентных *Enterococcus faecium*. Ванкомицинорезистентные *E.faecium*, включённые в исследование, имели МПК ванкомицина ≥ 64 мкг/мл (VAN-R), при этом у 11% изолятов чувствительность к тейкопланину была в диапазоне от 0,25 мкг/мл (TEC-S) до >16 мкг/мл. Липогликопептиды способны преодолевать устойчивость, связанную с наличием *vanB* гена, который ассоциирован с фенотипом устойчивости к ванкомицину (VAN-R) и чувствительности к тейкопланину (TEC-S) [4]. Ввиду того, что в исследовании не было проведено типирования генов устойчивости к ванкомицину, но используя только фенотипические данные, такие изоляты рассматривались как потенциально *vanB*-положительные. Энтерококки с фенотипом VAN-R/TEC-R характеризовались высокими значениями МПК к телаванцину и далбаванцину (МПК₉₀ более 16 мкг/мл). Энтерококки фенотипа VAN-R/TEC-S (11%) имели диапазон МПК далбаванцина и телаванцина от $\leq 0,016$ мкг/мл до ≥ 16 мкг/мл (см. таблицу).

Чувствительность к липогликопептидам у энтерококков разных видов и с разными механизмами устойчивости к ванкомицину является предметом для дальнейшего изучения. Устойчивостью к даптомицину (МПК 8 мкг/мл) характеризовались 11% изолятов. По данным различных исследований, устойчивость к даптомицину встречается среди энтерококков от 0 до 10% и чаще всего ассоциирована с *vanA*-положительными *E.faecium* [21, 22]. Эффективность использования даптомицина в клинической практике для лечения энтерококковых инфекций, в частности, в отношении изолятов с более



Изменение МПК липогликопептидов и даптомицина у изолятов MRSA с разной чувствительностью к ванкомицину

Changes in MICs of lipoglycopeptides and daptomycin in MRSA isolates with different sensitivity to vancomycin

высокими значениями МПК является предметом обсуждения [23]. Оритаванцин проявлял выраженную активность с диапазоном МПК от 0,03 мкг/мл до 0,5 мкг/мл при МПК₉₀ 0,25 мкг/мл, что подчёркивает потенциальную возможность его использования для лечения инфекций, вызываемых ванкомицин- и даптомициноустойчивыми энтерококками. На сегодняшний день оритаваксин официально не разрешён для применения в медицинской практике для лечения инфекций, вызванных ванкомицинорезистентными энтерококками, хотя клинические наблюдения использования off-label в клинической практике этого антибиотика демонстрируют его эффективность [6, 24]. Опыты по моделированию фармакодинамики и эксперименты на инфекционных моделях со штаммами VRE также свидетельствуют об эффективности данного антибиотика [25, 26].

Заключение

Добавление полисорбата 80 (Tween®80) в среду для оценки чувствительности к липогликопептидным антибиотикам является обязательным и в значительной степени влияет на результаты получаемых значений МПК. Липогликопептидные антибиотики проявляют выраженную активность в отношении как внебольничных MRSA, так и внутрибольничных MRSA, а также в отношении MRCoNS, циркулирующих в России, по сравнению с ванкомицином, тейкопланином и даптомицином с уровнем МПК₉₀ до 0,125 мкг/мл. Не было выявлено изолятов с высокими значениями МПК, однако отмечается тенденция к увеличению МПК у изолятов со сниженной чувствительностью к ванкомицину (13%). Оритаванцин демонстрирует активность в отношении ванкомицинорезистентных

энтерококков с МПК₉₀ 0,25 мкг/мл. Таким образом, липогликопептидные антибиотики являются альтернативой ванкомицину, даптомицину для лечения тяжёлых форм стафилококковых инфекций.

Литература/References

1. Blaskovich M. A. T., Hansford K. A., Butler M. S. et al. Developments in glycopeptide antibiotics. ACS Infect Dis. 2018; 4 (5): 715–735. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00258.
2. Smith J. R., Roberts K. D., Rybak M. J. Dalbavancin: A novel lipoglycopeptide antibiotic with extended activity against gram-positive infections. Infect Dis Ther. 2015; 4 (3): 245–258. doi: 10.1007/s40121-015-0077-7.
3. Karlowsky J. A., Nichol K., Zhanel G. G. Telavancin: mechanisms of action, *in vitro* activity, and mechanisms of resistance. Clin Infect Dis. 2015; 61: Suppl 2: S58–68. doi: 10.1093/cid/civ534.
4. Binda E., Marinelli F., Marcone G. L. Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. Antibiotics (Basel). 2014; 3 (4): 572–594. doi: 10.3390/antibiotics3040572.
5. Brade K. D., Rybak J. M., Rybak M. J. Oritavancin: A new lipoglycopeptide antibiotic in the treatment of gram-positive infections. Infect Dis Ther. 2016; 5 (1): 1–15. doi: 10.1007/s40121-016-0103-4.
6. Scoble P. J., Reilly J., Tillotson G. S. Real-world use of oritavancin for the treatment of osteomyelitis. Drugs Real World Outcomes. 2020; 7: Suppl 1: 46–54. doi: 10.1007/s40801-020-00194-8.
7. Lampejo T. Dalbavancin and telavancin in the treatment of infective endocarditis: a literature review. Int J Antimicrob Agents. 2020; 56 (3): 106072. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106072.
8. Reilly J., Jacobs M. A., Friedman B. et al. Clinical experience with telavancin for the treatment of patients with bacteremia and endocarditis: real-world results from the Telavancin Observational Use Registry (TOURTM). Drugs Real World Outcomes. 2020; 7 (3): 179–189. doi: 10.1007/s40801-020-00191-x.
9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-Ed32. 2022.
10. Arhin F. F., Sarmiento L., Belley A. et al. Effect of polysorbate 80 on oritavancin binding to plastic surfaces: implications for susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (5): 1597–1603. doi: 10.1128/AAC.01513-07.
11. Kavanagh A., Ramu S., Gong Y. et al. Effects of microplate type and broth additives on microdilution MIC susceptibility assays. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 63 (1). doi: 10.1128/AAC.01760-18.
12. Pfaller M. A., Sader H. S., Flamm R. K. et al. Oritavancin *in vitro* activity against gram-positive organisms from European and United States medical centers: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program for 2010–2014. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018; 91 (2): 199–204. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.029.
13. Pfaller M. A., Flamm R. K., Castanheira M. et al. Dalbavancin *in-vitro* activity obtained against Gram-positive clinical isolates causing bone and joint infections in US and European hospitals (2011–2016). Int J Antimicrob Agents. 2018; 51 (4): 608–611. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.011.
14. Duncan L. R., Sader H. S., Huband M. D. et al. Antimicrobial activity of telavancin tested *in vitro* against a global collection of gram-positive

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда 18-75-10114-П.

- pathogens, including multidrug-resistant isolates (2015–2017). Microb Drug Resist. 2020; 26 (8): 934–943. doi: 10.1089/mdr.2019.0104.
15. Saravolatz L. D., Pawlak J. VISA-Daptomycin non-susceptible *Staphylococcus aureus* frequently demonstrate non-susceptibility to Telavancin. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019; 93 (2): 159–161. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.003.
 16. Werth B. J., Jain R., Hahn A. et al. Emergence of dalbavancin non-susceptible, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) after treatment of MRSA central line-associated bloodstream infection with a dalbavancin— and vancomycin-containing regimen. Clin Microbiol Infect. 2018; 24 (4): 429 e1–429 e5. doi: 10.1016/j.cmi.2017.07.028.
 17. Steele J. M., Seabury R. W., Hale C. M., Mogle B. T. Unsuccessful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis with dalbavancin. J Clin Pharm Ther. 2018; 43 (1): 101–103. doi: 10.1111/jcpt.12580.
 18. Riccobono E., Giani T., Baldi G. et al. Update on activity of dalbavancin and comparators against clinical isolates of Gram-positive pathogens from Europe and Russia (2017–2018), and on clonal distribution of MRSA. Int J Antimicrob Agents. 2022; 59 (2): 106503. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106503.
 19. Kaushal R., Hassoun A. Successful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection with telavancin. J Antimicrob Chemother. 2012; 67 (8): 2052–2053. doi: 10.1093/jac/dks165.
 20. Bouza E., Valerio M., Soriano A. et al. Dalbavancin in the treatment of different gram-positive infections: a real-life experience. Int J Antimicrob Agents. 2018; 51 (4): 571–577. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.008.
 21. Bender J. K., Cattoir V., Hegstad K. et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. Drug Resist Updat. 2018; 40: 25–39. doi: 10.1016/j.drug.2018.10.002.
 22. Li L., Higgs C., Turner A. M. et al. Daptomycin resistance occurs predominantly in vana-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Australasia and is associated with heterogeneous and novel mutations. Front Microbiol. 2021; 12: 749935. doi: 10.3389/fmicb.2021.749935.
 23. Casapao A. M., Kullar R., Davis S. L. et al. Multicenter study of high-dose daptomycin for treatment of enterococcal infections. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57 (9): 4190–4196. doi: 10.1128/AAC.00526-13.
 24. Johnson J. A., Feeney E. R., Kubiak D. W., Corey G. R. Prolonged use of oritavancin for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* prosthetic valve endocarditis. Open Forum Infect Dis. 2015; 2 (4): ofv156. doi: 10.1093/ofid/ofv156.
 25. Belley A., Lalonde-Seguin D., Arhin F. F., Moeck G. Comparative pharmacodynamics of single-dose oritavancin and daily high-dose daptomycin regimens against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model of infection. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61 (10): e01265-17. doi: 10.1128/AAC.01265-17.
 26. Meyer K. A., Deraedt M. E., Harrington A. T. et al. Efficacy of oritavancin alone and in combination against vancomycin-susceptible and -resistant enterococci in an *in-vivo* *Galleria mellonella* survival model. Int J Antimicrob Agents. 2019; 54 (2): 197–201. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.04.010.

Информация об авторах

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России. Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Сулян Офелия Спартаковна — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-3493-0583. WOS Researcher ID: AAB-3314-2021. Scopus Author ID: 57219423522

About the authors

Vladimir V. Gostev — Ph.D. in Biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases; North-Western State Medical University Named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Ofeilia S. Sulian — Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-3493-0583. WOS Researcher ID: AAB-3314-2021. Scopus Author ID: 57219423522

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Попенко Любовь Николаевна — заведующая микробиологической лабораторией Санкт-Петербургского научно-исследовательского института скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия. Scopus Author ID: 55949337200

Круглов Александр Николаевич — к. б. н., заведующий лабораторией клинической микробиологии, врач-бактериолог ГБУЗ многопрофильного клинического центра «Коммунарка» ДЗМ, Москва, Россия. Scopus Author ID: 23489202100. ORCID: 0000-0001-6849-0008

Гордеева Светлана Александровна — заведующая лабораторией, централизованная бактериологическая лаборатория, СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина», Санкт-Петербург, Россия. Scopus Author ID: 57201845051

Нестерова Елена Викторовна — врач-бактериолог, клинико-диагностическая лаборатория, Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городской кожно-венерологический диспансер», Санкт-Петербург, Россия

Гладин Дмитрий Павлович — к. м. н., доцент, и. о. заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-4957-7110, Scopus Author ID: 6603374770

Трофимова Наталья Николаевна — врач-бактериолог, клинико-диагностическая лаборатория, Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городской кожно-венерологический диспансер», Санкт-Петербург, Россия

Чулкова Полина Сергеевна — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства». ORCID: 0000-0002-6279-944X. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Агеевец Ирина Владимировна — к. м. н., Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-3549-3525. WOS Researcher ID: F-8698-2017. Scopus Author ID: 57189621346

Агеевец Владимир Андреевич — к. б. н., Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

Черненко Татьяна Витальевна — к. м. н., заведующая научной лабораторией клинической микробиологии ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского ДЗМ, Москва, Россия. Scopus Author ID: 7801648630

Olga S. Kalinogorskaya — Ph.D. in Medicine, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Lyubov N. Popenko — Head of the Microbiological Laboratory, St. Petersburg I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, Saint Petersburg, Russia. Scopus Author ID: 55949337200

Alexander N. Kruglov — Ph. D. in Biology, Head of the Laboratory of Clinical Microbiology, bacteriologist, Moscow Multidisciplinary Clinical Center «Kommunarka», Moscow, Russia. Scopus Author ID: 23489202100 ORCID: 0000-0001-6849-0008

Svetlana A. Gordeeva — Head of the Centralized Bacteriological Laboratory, Clinical Infectious Diseases Hospital named after S. P. Botkin, Saint Petersburg, Russia. Scopus Author ID: 57201845051

Elena V. Nesterova — bacteriologist at the Clinical Diagnostic Laboratory, City Skin and Venereal Diseases Dispensary, Saint Petersburg, Russia

Dmitrii P. Gladin — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, Acting Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-4957-7110, Scopus Author ID: 6603374770

Natalya N. Trofimova — bacteriologist at the Clinical Diagnostic Laboratory, City Skin and Venereal Diseases Dispensary, Saint Petersburg, Russia

Polina S. Chulkova — Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-6279-944X. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Irina V. Ageevets — Ph. D. in Medicine, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3549-3525. WOS Researcher ID: F-8698-2017. Scopus Author ID: 57189621346

Vladimir A. Ageevets — Ph. D. in Biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

Tatyana V. Chernenkaya — Ph. D. in Medicine, Head of the Scientific Laboratory of Clinical Microbiology, N. V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia. Scopus Author ID: 7801648630

Синергетическая комбинация амфотерицина В и антисептика мирамистина может быть эффективной в борьбе с лекарственно-устойчивыми изолятами грибов рода *Candida*

*М. А. КИРСАНОВА, Ю. Л. КРИВОРУТЧЕНКО,
О. Н. ПОСТНИКОВА, И. Б. АНДРОНОВСКАЯ

Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского, Симферополь, Россия

Synergistic Combination of Amphotericin B and Antiseptic Miramistin May Be Effective in the Fight Against Drug-Resistant Isolates of *Candida* Fungi

*MARINA A. KIRSANOVA, YURI L. KRIVORUTCHENKO,
OLGA N. POSTNIKOVA, IRINA B. ANDRONOVSKAJA

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, Simferopol, Russia

Резюме

Создание синергетических комбинаций противогрибковых и антисептических средств можно рассматривать как одну из перспективных стратегий снижения распространения лекарственной устойчивости у патогенных грибов.

Цель. Изучение синергетической антифунгальной активности амфотерицина В (АМВ) и антисептика мирамистина (МСТ) при их комбинированном применении для борьбы с грибами рода *Candida*, устойчивыми к лекарственным препаратам.

Материал и методы. Исследовали устойчивый к АМВ штамм *C. albicans* (минимальная подавляющая концентрация (МПК) 3,1 мкг/мл), чувствительный к МСТ, два изолята *C. albicans* с различной устойчивостью к МСТ и АМВ (МПК 1,6–6,3 мкг/мл) и один МСТ-устойчивый изолят *C. lusitanae*, чувствительный к АМВ (МПК 0,4 мкг/мл). Чувствительность изолятов к АМВ и МСТ по отдельности определяли с помощью метода микроразведений в бульоне и количественного суспензионного метода определения скорости инактивации грибов, соответственно. Индивидуальную противокандидозную активность препаратов сравнивали с активностью комбинаций 0,001% МСТ с АМВ в концентрациях 10 или 50 мкг/мл с помощью определения скорости инактивации грибов.

Результаты. Значительное снижение роста всех изолятов, обработанных обеими комбинациями МСТ и АМВ, по сравнению с обработкой отдельными препаратами, наблюдалось в каждом изученном временном интервале (15–60 мин). В составе комбинации МСТ проявлял значительный синергизм с АМВ в сублетальной концентрации 10 мкг/мл, действуя против всех изолятов. Обработка грибов комбинацией МСТ с АМВ в концентрации 50 мкг/мл вызывала полную инактивацию всех изолятов после 30-минутной инкубации. В этих условиях АМВ проявлял антифунгальную активность, действуя отдельно.

Заключение. Полученные результаты предполагают возможное эффективное использование мирамистина в комбинации с амфотерицином В против изолятов грибов рода *Candida*, имеющих множественную лекарственную устойчивость.

Ключевые слова: *Candida* spp.; лекарственная устойчивость; антисептик; мирамистин; синергия; амфотерицин В

Для цитирования: Кирсанова М. А., Криворутченко Ю. Л., Постникова О. Н., Андроновская И. Б. Синергетическая комбинация амфотерицина В и антисептика мирамистина может быть эффективной в борьбе с лекарственно-устойчивыми изолятами грибов рода *Candida*. Антибиотики и химиотер. 2022; 67: 9–10: 25–34. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-25-34>.

Abstract

Creation of synergistic combinations of antifungal and antiseptic agents can be considered as one of the promising strategies for reducing the spread of drug resistance in pathogenic fungi.

Aim. The aim of this work was to study the synergistic antifungal activity of amphotericin B (AMB) and antiseptic miramistin (MST) in their combined use to fight against drug-resistant *Candida* isolates.

Material and methods. One AMB-resistant *C.albicans* strain (MIC 3.1 µg/ml), sensitive to MST, two isolates of *C.albicans* with different level of resistance to MST and AMB (MIC 1.6–6.3 µg/ml), and one MST-resistant *C.lusitaniae* isolate susceptible to AMB (MIC 0.4 µg/ml) were studied. Isolates' susceptibility to AMB and MST alone was determined by broth micro-dilution method and time–kill assay, respectively. Individual anti-candida activity of test combinations of 0.001% MST with AMB in 10 or 50 µg/ml concentrations was studied using quantitative time–kill assay.

Results. A significant decrease in the growth of all the isolates treated with both test combinations of MST and AMB in comparison with individual medication treatment was observed at each time interval studied (15–60 minutes). As part of the combination, MST exhibited significant synergy with AMB in sublethal concentration of 10 µg/ml against all the isolates. Treatment of the fungi with a combination of MST with AMB in 50 µg/ml concentration caused complete inactivation of all the isolates after 30 minutes. Under these conditions, AMB exhibited separate antifungal activity.

Conclusion. These findings suggest the possible effective use of miramistin in combination with amphotericin B against multi-drug resistant isolates of the genus *Candida*.

Keywords: *Candida* spp.; drug resistance; antiseptic miramistin; synergy; amphotericin B

For citation: Kirsanova M.A., Krivorutchenko Yu.L., Postnikova O.N., Andronovskaya I.B. Synergistic combination of amphotericin b and antiseptic miramistin may be effective in the fight against drug-resistant isolates of *Candida* fungi. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 25–34. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-25-34>.

Введение

Растущее распространение грибковых инфекций, в том числе с тяжёлым течением, определяется ростом числа лиц из групп риска, ограниченным арсеналом антифунгальных средств и развитием устойчивости микроорганизмов к противогрибковым препаратам. Грибы рода *Candida* — наиболее частая причина микозов у иммунокомпрометированных лиц. Среди них увеличивается распространение устойчивости к антисептикам и антимикотикам классов азолов, эхинокандинов и полиенов, увеличивается доля мультирезистентных изолятов грибов, устойчивых одновременно к препаратам двух и более классов [1–3].

Основными путями решения проблемы распространения резистентности к противогрибковым препаратам является скрининг, направленный на выявление новых антифунгальных веществ, к которым грибы ещё не устойчивы, а также разработка способов преодоления уже сформировавшейся лекарственной устойчивости к применяемым препаратам. Основными путями реализации второго подхода считаются проведение комбинированной химиотерапии и создание комpositитных противогрибковых средств, повышающих чувствительность возбудителей к отдельным компонентам композиции [4, 5]. Целью комбинированной терапии является достижение синергетического взаимодействия между двумя или большим числом лекарственных веществ, при котором станет возможным продление срока службы применяемых сегодня препаратов за счёт замедления процессов развития микробной резистентности к каждому из компонентов лекарственной смеси. Считается, что применение синергетической комбинации противомикробных средств может повысить активность отдельных препаратов, входящих в состав смеси, и снизить их токсическое действие за счёт уменьшения эф-

фективной терапевтической дозы [6]. В отношении поиска средств для комбинированной терапии микозов, вызываемых резистентными микроорганизмами, большое внимание уделяется биоплёнкам, усиливающим способность грибов к формированию лекарственной устойчивости.

В частности, было показано, что комбинация антимикотика флуконазола с производным Н (1,4-дигидропиридин-2,3,5-трикарбоксилат), являющимся промежуточным продуктом синтеза блокатора кальциевых каналов нилвадипина, более эффективно разрушает биоплёнки *Candida albicans*, чем каждое из этих веществ, взятое в индивидуальной форме (по отдельности) [7]. Комбинированное применение флуконазола и кверцетина (пищевое флавоноид с антиоксидантной активностью, подавляющего образование биоплёнок) продемонстрировало синергетический эффект в отношении биоплёнкообразующих и планктонных культур *C.albicans*, устойчивых к флуконазолу. Эффект был связан со снижением адгезивности и гидрофобности грибов, ингибированием их способности переходить из дрожжевой формы в гифальную. Комбинированная терапия этими веществами экспериментального кандидозного вульвовагинита мышей приводила к ускоренному снижению грибковой колонизации тканей и исчезновению симптомов заболевания [8].

Для лечения и профилактики грибковых поражений используются различные комбинации антисептиков, а также антисептиков и антимикотиков. Изучение комбинированного и индивидуального воздействия антисептиков хлоргексидина глюконата, цетилпиридиний хлорида и триклозана на грибы с разной чувствительностью к азолам показало, что комбинированное применение антисептиков может давать синергетический эффект в отношении *C.tropicalis* и *C.krusei*, устойчивых к флуконазолу [9, 10].

Сведения о возможности достижения синергетического эффекта при комбинированном при-

менении антисептиков и антимикотиков достаточно противоречивы. Так, сообщалось об антагонизме антисептика хлоргексидина и полиенового антимикотика нистатина, выявленном при изучении комбинированного действия препаратов на *C.albicans* ATCC 18804. При применении этих веществ в виде смеси их минимальные ингибирующие концентрации (МПК) не изменялись по сравнению с МПК каждого препарата, взятого в отдельности. Когда же нистатин и хлоргексидин вводили один после другого через разные интервалы времени, значения их МПК становились больше, чем у тех же веществ в индивидуальной форме. Комбинации этих веществ ингибировали образование биоплёнок грибами слабее, чем индивидуальные препараты. Анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии показал, что в смесях оба эти вещества интенсивно деградировали [11]. Вместе с тем сообщалось, что комбинированное применение 2% хлоргексидина глюконата и 1% антимикотика клотримазола при промывании зубных каналов, инокулированных *C.albicans*, усиливало антифунгальное действие препаратов [12].

Мирамистин (бензил диметил [3-(миристоилиамино) пропил] аммоний хлорид, моногидрат) широко используется в Российской Федерации в качестве дезинфектанта и антисептика для местного применения. Этот хлорсодержащий катионный детергент, относящийся к четвертичным аммониевым соединениям, обладает широким спектром противомикробной активности. В стандартных тестах было показано, что мирамистин обладает выраженным бактерицидным эффектом в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 209p и *Escherichia coli* (CDC F-50). Было установлено, что МПК и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) мирамистина для стафилококков составляли 8 мкг/мл и 16 мкг/мл, а для кишечной палочки — 32 и 128 мкг/мл, соответственно. В суспензионном тесте мирамистин снижал концентрацию жизнеспособных клеток *S.aureus* на 6 log₁₀, а *E.coli* — на 4,5 log₁₀ [13]. При короткой 30-минутной инкубации *S.aureus*, *E.coli* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии антисептика мирамистин полностью подавлял активность бактерий в концентрациях 0,003, 0,0125 и 0,05%, соответственно [14]. Мирамистин демонстрировал и выраженную антифунгальную активность. Так, в экспериментах *in vitro* он одинаково эффективно подавлял рост грибов (МПК для дрожжевых грибов разных видов 1,7–3,1 мкг/мл) как устойчивых, так и чувствительных к флуконазолу и итраконазолу. В опытах *in vivo* введение мирамистина в дозе 16 мг/кг в гемоцель личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*, заражённых *C.albicans* или *Aspergillus fumigatus*, значительно увеличивало выживаемость личинок [2].

Впервые для лечения инвазивного кандидоза с использованием синергетического эффекта препаратов была применена комбинация антимикотиков амфотерицина В (АМВ) и флуцитозина. Монотерапия флуцитозином обычно приводит к быстрому развитию лекарственной устойчивости. Его комбинированное применение вместе с АМВ позволило замедлить развитие лекарственной устойчивости к флуцитозину и снизить число вызываемых им осложнений [15]. Комбинированное использование этих препаратов для лечения криптококкоза привело к увеличению частоты выздоровлений и клинических ремиссий у больных по сравнению с монотерапией амфотерицином В [16].

АМВ — полиеновый антибиотик, применяемый для лечения генерализованных микозов. Он обладает синергетическим действием на грибы рода *Candida* при комбинированном применении с полисахаридами хитозана, аспирином, лактоферрином и эфирными маслами [17–19]. В частности, было установлено, что компоненты эфирных масел цитраль и циннамальдегид из растения пальмароза (*Cymbopogon martinii*) могут подавлять рост антимикотико-резистентных изолятов *C.albicans*. Их ингибиторная активность (МПК₅₀ 90–100 мкг/мл) превосходила активность азолов и АМВ в отношении устойчивых к ним грибов. Исследованные эфирные масла (особенно эвгенол) проявляли значительную синергетическую активность с АМВ и флуконазолом [20]. Было установлено синергетическое взаимодействие АМВ с маслом чайного дерева. Фунгицидный эффект в отношении *C.albicans* достигался при использовании комбинации АМВ с маслом чайного дерева в концентрациях 0,25 и 0,08 мкг/мл, соответственно [21]. Синергетический антифунгальный эффект был обнаружен и при комбинировании АМВ с пептидом иммунной системы лактоферрином. Комбинированное использование рекомбинантного лактоферрина (талактоферрина) с АМВ или флуконазолом выявило синергетическое подавляющее воздействие веществ на формирование биоплёнок *C.albicans* [22].

Сравнение ингибирования роста грибов рода *Fusarium* различными антимикотиками и антисептиком хлоргексидином показало, что антифунгальный эффект АМВ по силе близок к действию хлоргексидина. При исследовании методом микроразведений и 48-часовой инкубации грибов с препаратами хлоргексидин был активен против всех изолятов в концентрации 8–32 мкг/мл. МПК амфотерицина В в этих условиях колебалась в пределах 0,5–4,0 мкг/мл [23].

Учитывая широкое применение мирамистина и амфотерицина В, сопровождающееся формированием у грибов лекарственной устойчивости, а также отсутствие сведений об их комбинированном противогрибковом действии, представ-

лялось интересным исследование совместного воздействия этих препаратов на патогенные дрожжеподобные грибы.

Цель работы — изучение синергетической антифунгальной активности АМВ и мирамистина при их комбинированном применении для борьбы с изолятами грибов рода *Candida*, имеющими устойчивость к одному из указанных веществ или к обоим препаратам.

Материал и методы

В работе использовали штамм *C.albicans* CCM 885, полученный в ГИСК им. Л. А. Тарасевича (г. Москва, Россия), и изоляты грибов, выделенных от больных, — *C.albicans* №71, *C.albicans* №59 и *Candida lusitanae* №69. Идентификацию грибов проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам с использованием тест-системы «Аухосолор 2» (BioRad, Франция).

Для исследований был использован мирамистин, полученный на предприятии КНВМП «ИСНА» (Киев, Украина), и антимикотик амфотерицин В (Bristol-Myers Squibb, Франция).

Чувствительность грибов к мирамистину определяли в соответствии с рекомендациями Европейского Стандарта количественного суспензионного теста по скорости инактивации грибов [24]. Для определения чувствительности грибов к мирамистину использовали инокуляты грибов с концентрацией микроорганизмов 5×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Для их получения грибы выращивали на твёрдой среде Сабуро (НПО «Микроген», Махачкала, Россия) в течение 48 ч при 28°C. Затем микробные колонии смывали с поверхности среды стерильным изотоническим раствором хлорида натрия, тщательно суспендировали и доводили до указанной конечной концентрации. Инокуляты по 1 мл вносили в 9 мл 0,01% раствора мирамистина (концентрация в препарате Окомистин) в дистиллированной воде. В контроле инокуляты в той же пропорции вносили в дистиллированную воду. Полученные смеси инкубировали в ротационном термостате при 37°C и скорости перемешивания 100 оборотов в минуту. Образцы смесей по 0,1 мл отбирали через 15, 30 и 60 мин инкубации. Их высевали на агар Сабуро и инкубировали 48 ч при 37°C, после чего подсчитывали количество выросших колоний. Выживаемость грибов после контакта с мирамистином определяли в процентах по отношению к количеству колоний в контроле, которое принимали за 100%. Устойчивыми к мирамистину считали грибы, имевшие выживаемость более 15%, 5% и 0% после 15, 30 и 60 мин инкубации, соответственно, в присутствии 0,01% антисептика.

Чувствительность грибов к амфотерицину В определяли с помощью модифицированного метода серийных разведений на среде RPMI-1640. По технике постановки он был близок методике, рекомендованной документом NCCLS M23-A (США) для определения МПК амфотерицина В и других антимикотиков в отношении дрожжеподобных грибов [25]. Для определения МПК АМВ использовали стерильные 96-луночные пластиковые планшеты (ПО «Ленмедполимер», Россия) и среду RPMI-1640 (ООО «БилоТ», Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 3% лошадиной сыворотки (ППБП, Харьков, Украина). Для получения инокулята грибов нужной концентрации их выращивали на твёрдой среде Сабуро в течение 48 ч при 28°C. Затем производили смыв культуры микроорганизмов с поверхности агаризованной среды стерильным изотоническим раствором. Полученную взвесь грибов разводили на среде RPMI-1640 до концентрации клеток $2,5\text{--}1,5 \times 10^3$ КОЕ/мл. Этот инокулят в объёме 0,01 мл добавляли в лунки планшет, содержащие по 0,1 мл серийных двукратных разведений антимикотика в среде RPMI-1640 с сывороткой. Планшеты инкубировали 20 ч при 28°C в атмосфере 5% CO₂. Затем из

каждой лунки брали по 0,1 мл содержимого и наносили эти пробы на поверхность среды Сабуро в чашках Петри без АМВ. Далее в течение 48 ч проводили инкубацию при 28°C, после чего производили учёт роста грибов. МПК определяли как наименьшую концентрацию антимикотика, вызывавшую полное подавление роста грибов. Чувствительными к амфотерицину В считали изоляты грибов, для которых МПК была $\leq 1,0$ мкг/мл, устойчивыми — изоляты, для которых МПК была $\geq 2,0$ мкг/мл. Грибы, для которых значения МПК были больше 1,0 мкг/мл, но меньше 2,0 мкг/мл, считали умеренно чувствительными.

Для изучения сочетанного действия мирамистина и амфотерицина В готовили стандартные инокуляты грибов с концентрацией 5×10^6 КОЕ/мл как описано выше. Инокуляты по 1 мл вносили в 9 мл водных растворов изучавшихся препаратов в концентрациях: мирамистина — 0,001%, АМВ — 10 мкг/мл или 50 мкг/мл. Грибы инкубировали или с указанными разведениями препаратов, взятых по отдельности, или со смесями препаратов: мирамистин 0,001% + АМВ — 10 мкг/мл или мирамистин 0,001% + АМВ — 50 мкг/мл. В контроле инокуляты в той же пропорции вносили в дистиллированную воду. Инкубацию грибов в присутствии препаратов проводили в ротационном термостате при 30°C и скорости перемешивания 100 оборотов в минуту. Через 15, 30 и 60 мин инкубации проводили отбор образцов смесей для учёта времени и степени инактивации грибов исследуемыми препаратами при их индивидуальном или комбинированном применении. Для этого образцы смесей по 10 мкл вносили в 190 мкл жидкой среды Сабуро (200-кратное разведение) в лунки стерильных 96-луночных плоскодонных пластиковых планшет. Каждый образец исследовался в трёх повторах. Далее планшеты инкубировали в планшетном спектрофотометре Мультискан FC (Thermo scientific, Финляндия) при температуре 30°C, 48 ч. Результаты учитывались по изменению оптической плотности (D) при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали инкубацию грибов только с мирамистином, только с амфотерицином В, только со стерильной водой в течение указанных выше временных интервалов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-теста Стьюдента для непарных выборок, используя комплект программ Microsoft Office Excel 5,0. Определяли средние значения и ошибки средних значений ($M \pm m$). Достоверными считали различия при значениях $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования чувствительности к мирамистину и АМВ трёх изолятов грибов рода *Candida* и штамма *C.albicans* CCM 885, представлены в табл. 1.

Грибы имели разную чувствительность к мирамистину и АМВ. Штамм *C.albicans* CCM 885 был устойчив только к АМВ, изолят *C.lusitanae* №69 — только к мирамистину. Изолят *C.albicans* №71 был чувствителен к мирамистину и умеренно чувствителен к АМВ. Изолят *C.albicans* №59 был устойчив к обоим препаратам. На этих культурах грибов было изучено комбинированное действие 0,001% мирамистина и АМВ в концентрациях 10 и 50 мкг/мл.

Результаты изучения индивидуального и комбинированного действия мирамистина и АМВ на дрожжеподобные грибы при 15-минутной инкубации представлены на рис. 1.

При 15-минутном комбинированном воздействии мирамистина и АМВ в обеих концентрациях

Таблица 1. Чувствительность грибов рода *Candida* к 0,01% раствору мирамистина и амфотерицину В
Table 1. Sensitivity of fungi of *Candida* genus to 0.01% solution of miramistin and amphotericin B

Грибы	Мирамистин		Амфотерицин В	
	Выживаемость после 15, 30 и 60 мин инкубации, %		МИК, мкг/мл	
<i>C.albicans</i> CCM 885	5, 2 и 0	Ч	3,12	У
<i>C.albicans</i> №71	16, 2 и 0	Ч	1,56	УЧ
<i>C.albicans</i> №59	50, 40 и 20	У	6,25	У
<i>C.lusitaniae</i> №69	17, 14 и 6	У	0,39	Ч

Примечание. Ч — чувствительный; У — устойчивый; УЧ — умеренно-чувствительный.

Note. Ч — sensitive; У — resistant; УЧ — moderately sensitive.

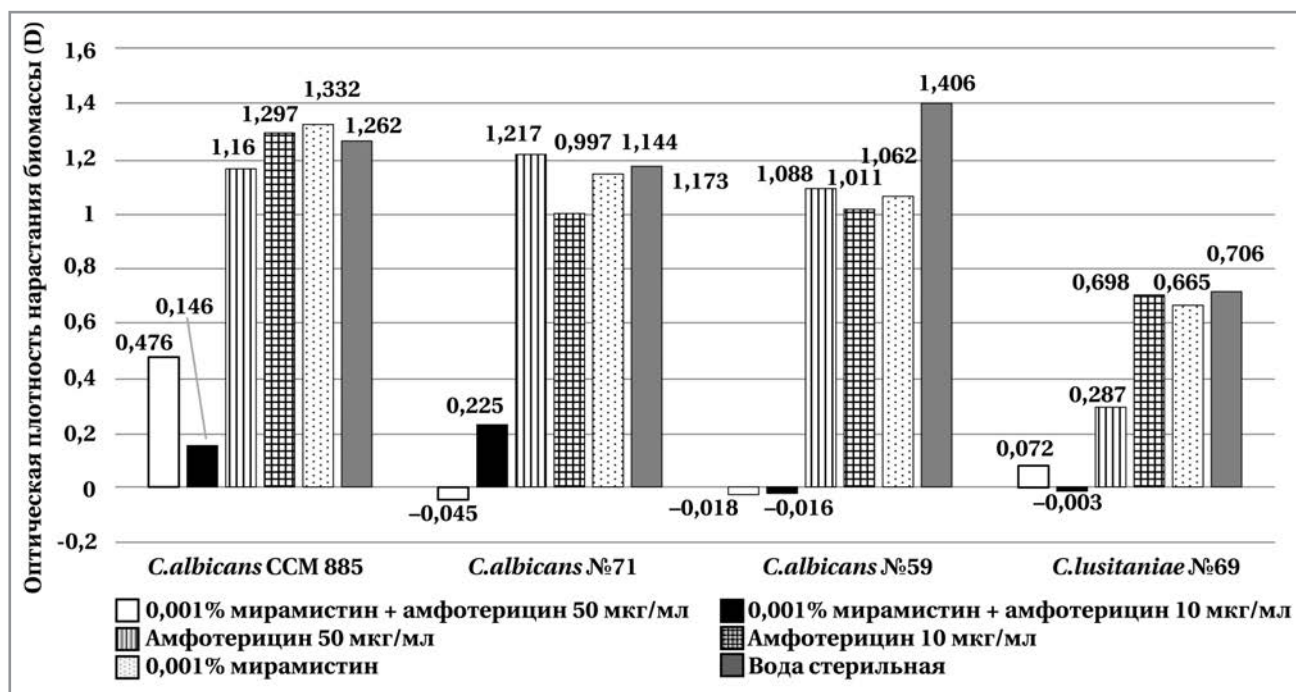


Рис. 1. Комбинированное и индивидуальное действие мирамистина и амфотерицина В на рост дрожжеподобных грибов при инкубации в течение 15 мин.

Fig. 1. Combined and individual effect of miramistin and amphotericin B on the growth of yeast-like fungi during 15-minute incubation.

происходило полное подавление роста грибов *C.albicans* №59, устойчивых к обоим препаратам по отдельности, и отсутствовало подавление роста *C.albicans* CCM885. При комбинированном использовании мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл наблюдался слабый рост (12–19% от роста в контроле с водой) чувствительных к мирамистину *C.albicans* CCM885 и *C.albicans* №71, устойчивых и умеренно чувствительных к АМВ, соответственно. При комбинированном применении препаратов подавлялся рост устойчивых к мирамистину *C.albicans* №59 и *C.lusitaniae* №69 с разной чувствительностью к АМВ. Сочетанное применение мирамистина с АМВ в концентрации 50 мкг/мл полностью подавляло рост грибов *C.albicans* №71, чувствительных к обоим веществам, и устойчивых к ним *C.albicans* №59. Наблюдался умеренный рост *C.albicans* CCM885 и слабый рост (10% от контроля) *C.lusitaniae* №69, имевших про-

тивоволожные профили индивидуальной чувствительности к препаратам. При 15-минутной инкубации каждого из грибов с каждым препаратом, взятым в отдельности, подавления роста не наблюдалось.

Результаты изучения комбинированного действия мирамистина и АМВ на исследованные грибы при инкубации в течение 30 минут представлены на рис. 2.

30-минутная инкубация при комбинированном применении мирамистина и АМВ в концентрации 50 мкг/мл приводила к полному подавлению роста всех грибов. При воздействии обоими комбинациями препаратов происходило полное подавление роста *C.albicans* №59 и изолята *C.lusitaniae* №69, устойчивого к мирамистину и чувствительного к АМВ. При комбинированном применении мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл наблюдался слабый (2% от контроля)

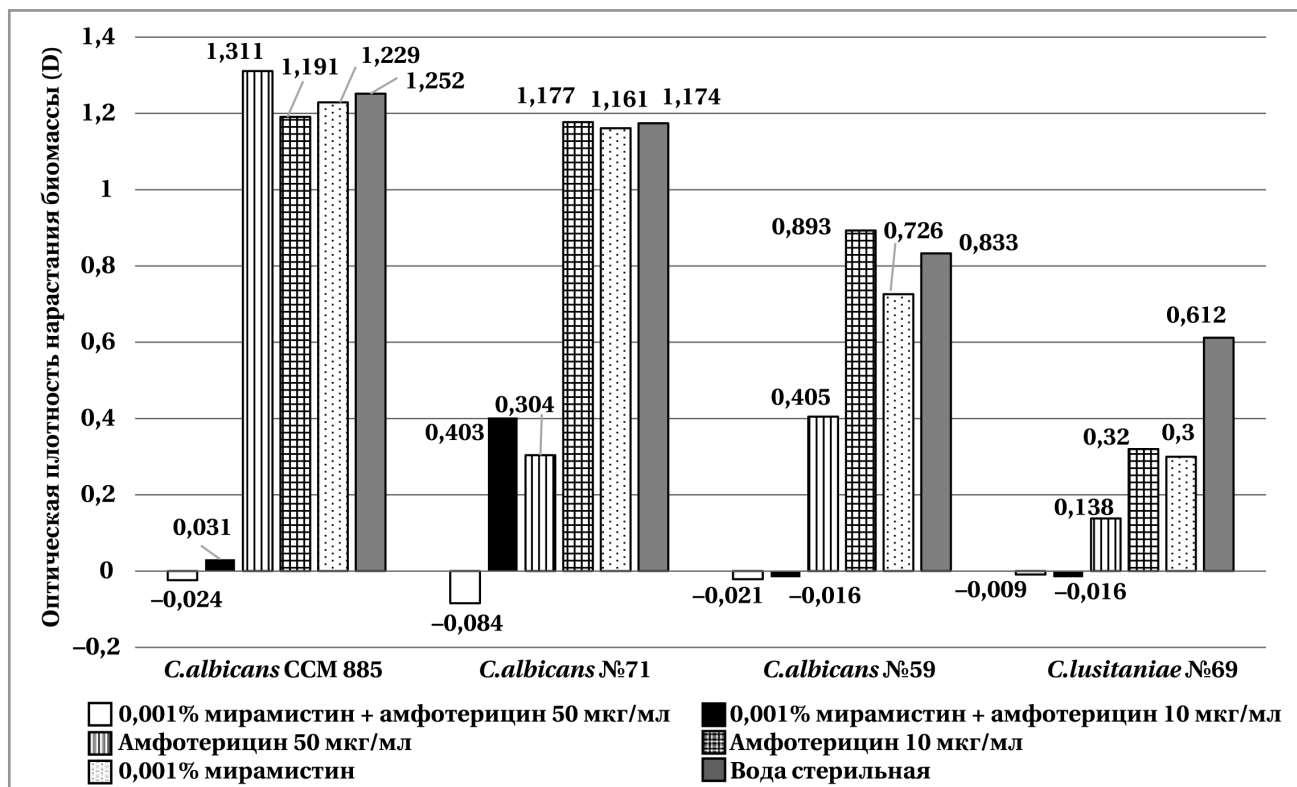


Рис. 2. Комбинированное и индивидуальное действие мирамистина и амфотерицина В на рост дрожжеподобных грибов после инкубации в течение 30 мин.

Fig. 2. Combined and individual effect of miramistin and amphotericin B on the growth of yeast-like fungi during 30-minute incubation.

или умеренный (34% от контроля) рост грибов *C.albicans* CCM885 и *C.albicans* №71, соответственно. 30-минутная инкубация грибов с индивидуальными препаратами не приводила к значимому подавлению их роста. Однако у грибов всех клинических изолятов наблюдалось 2–4-кратное снижение скорости накопления биомассы при их инкубации с АМВ в концентрации 50 мкг/мл.

Результаты изучения комбинированного действия мирамистина и АМВ на исследованные грибы при инкубации в течение 60 мин представлены на рис. 3.

После 1-часовой инкубации грибов при комбинированном применении мирамистина и АМВ в обеих концентрациях происходило полное подавление роста всех исследованных культур. При инкубации микроорганизмов в присутствии одного из препаратов — мирамистина или АМВ в концентрации 10 мкг/мл существенного подавления роста грибов не происходило. Однако инкубация грибов изолята *C.albicans* №59 в присутствии 50 мкг/мл АМВ без мирамистина приводила к полному подавлению их жизнедеятельности. Остальные культуры грибов выживали, но демонстрировали менее значительное накопление биомассы (в 2–4 раза) по сравнению с контролем при инкубации с водой.

Обобщённые данные, демонстрирующие зависимость от времени инкубации усреднённой

чувствительности грибов к 0,001% мирамистину и АМВ в обеих концентрациях при комбинированном и раздельном их применении, представлены в табл. 2.

Сравнение средних значений оптической плотности биомассы грибов, выросших после инкубации с препаратами в течение всех интервалов времени показало, что только комбинированное использование 0,001% мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл подавляло рост грибов достоверно сильнее (в 9–23 раза), чем в случаях инкубации с каждым индивидуальным препаратом. При раздельной инкубации микроорганизмов с препаратами показатели интенсивности роста грибов в опытах не отличались от показателей в контроле.

При 15-минутной инкубации и использовании АМФ в концентрации 50 мкг/мл комбинированное применение препаратов подавляло рост грибов достоверно сильнее (в 8–9 раз), чем в случаях инкубации с отдельными индивидуальными препаратами. Положение изменялось при более длительном применении АМВ в концентрации 50 мкг/мл. При 30-минутной и 1-часовой инкубации комбинированное использование препаратов по-прежнему ослабляло рост грибов сильнее, чем при изолированном применении веществ. Вместе с тем, различие в антифунгальном действии АМВ в концентрации 50 мкг/мл при его от-

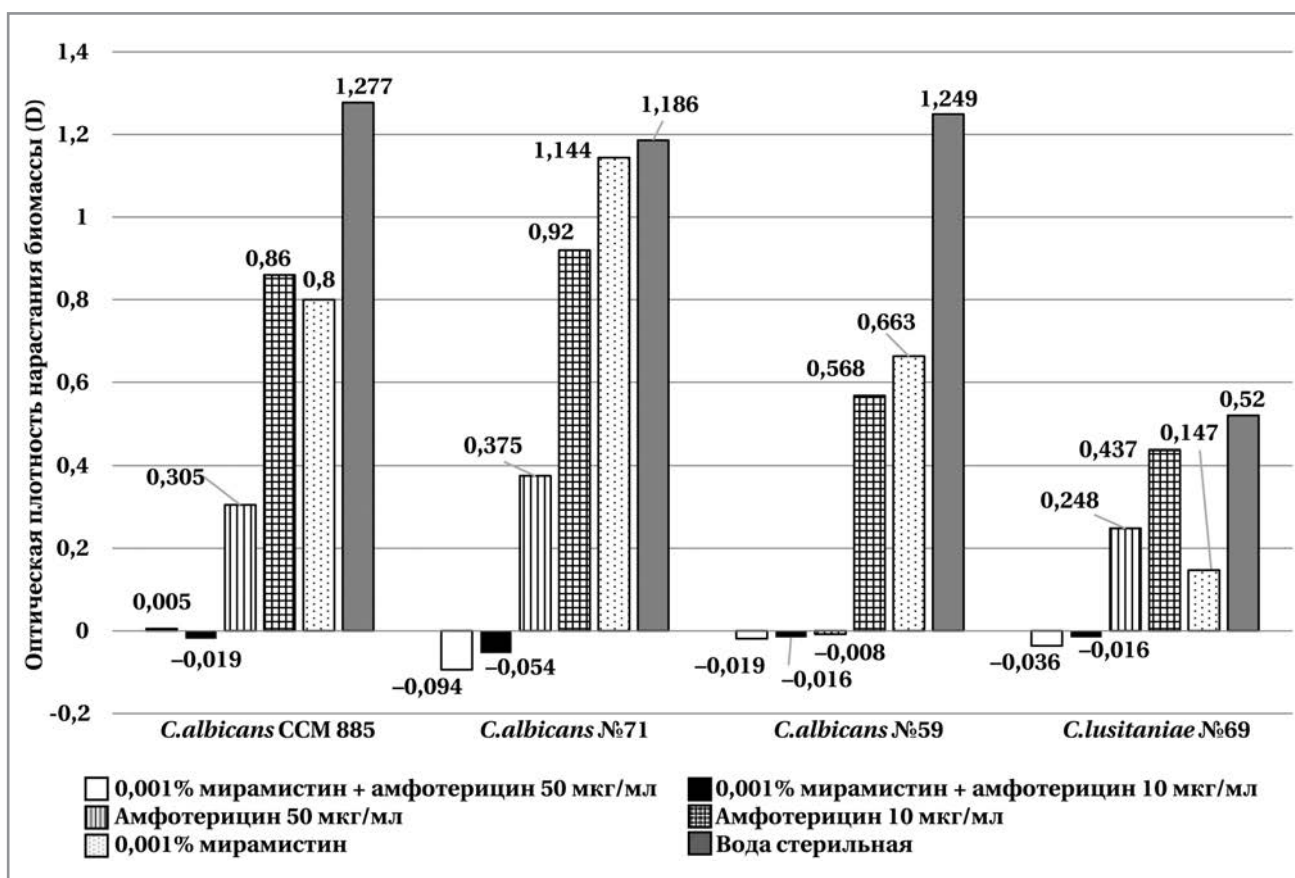


Рис. 3. Комбинированное и индивидуальное действие мирамистина и амфотерицина В на рост дрожжеподобных грибов после инкубации в течение 60 мин.

Fig. 3. Combined and individual effect of miramistin and amphotericin B on the growth of yeast-like fungi during 60-minute incubation.

Таблица 2. Зависимость комбинированного и индивидуального воздействия мирамистина и амфотерицина В на грибы рода *Candida* от времени инкубации

Table 2. Dependence of combined and individual effects of miramistin and amphotericin B on fungi of *Candida* genus on the incubation time

Время инкубации, мин	Средние значения ($M \pm m$), достоверность (p)	Изменения оптической плотности (D) биомассы грибов, выросших после инкубации с препаратами					
		МСТ 0,001% + АМВ 50 мг/л	МСТ 0,001% + АМВ 10 мг/л	АМВ 50 мг/л	АМВ 10 мг/л	МСТ 0,001%	вода
15	$M \pm m$	0,12 $\pm$ 0,12	0,09 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,22	1,00 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,14	1,14 $\pm$ 0,15
	p , вода	$p=0,002^*$	$p<0,001^*$	$p=0,48$	$p=0,51$	$p=0,69$	—
	p , АМВ	$p=0,017^*$	$p<0,001^*$	—	—	—	—
	p , МСТ	$p<0,001^*$	$p<0,001^*$	—	—	—	—
30	$M \pm m$	-0,03 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,10	0,54 $\pm$ 0,26	0,89 $\pm$ 0,20	0,87 $\pm$ 0,22	0,97 $\pm$ 0,15
	p , вода	$p=0,007^*$	$p=0,003^*$	$p=0,205$	$p=0,782$	$p=0,731$	—
	p , АМВ	$p=0,117$	$p=0,013^*$	—	—	—	—
	p , МСТ	$p=0,027^*$	$p=0,020^*$	—	—	—	—
60	$M \pm m$	-0,04 $\pm$ 0,02	-0,03 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,21	1,06 $\pm$ 0,18
	p , вода	$p=0,009^*$	$p=0,009^*$	$p=0,006^*$	$p=0,142$	$p=0,226$	—
	p , АМВ	$p=0,054$	$p=0,008^*$	—	—	—	—
	p , МСТ	$p=0,040^*$	$p=0,041^*$	—	—	—	—

Примечание. МСТ — мирамистин; АМВ — амфотерицин В; * — статистически достоверные различия.

Note. MCT — miramistin; AMB — amphotericin B; * — statistically significant differences.

дельном и комбинированном с мирамистином применении становилось недостоверным. В этой концентрации АМВ при 1-часовой инкубации ак-

тивно проявлял индивидуальное действие — вызывал четырёхкратное снижение накопления биомассы грибов по сравнению с контролем.

Обсуждение

Перспективным способом противодействия формированию устойчивости грибов к антифунгальным препаратам является создание синергетических комбинаций антимикотиков и других средств. Комбинированное применение нескольких препаратов, имеющих разные механизмы действия и обладающих синергизмом, может позволить снизить терапевтические дозы и, соответственно, токсичность отдельных веществ, входящих в комбинацию [26]. Впервые синергетический эффект был достигнут при проведении комбинированной терапии инвазивных микозов флуцитозином и АМВ. Эффект проявился в снижении устойчивости грибов к флуцитозину. Лечение криптококкоза с помощью такой терапии привело к увеличению частоты выздоровлений больных по сравнению с монотерапией АМВ [15, 16]. Выбор АМВ для нашего исследования был обусловлен его способностью проявлять синергизм при комбинированном применении с другими антифунгальными препаратами и тем, что он является одним из самых мощных антимикотиков. Антифунгальный эффект АМВ близок к фунгицидному действию антисептика хлоргексидина. АМВ интенсивно подавлял жизнедеятельность грибов рода *Fusarium* (МПК 0,5–4,0 мкг/мл), *Candida* (МПК 0,25–128 мкг/мл) и других типов [20, 23]. В своём исследовании мы использовали четыре культуры грибов рода *Candida*, чувствительность которых к АМВ (МПК 0,39–6,25 мкг/мл) находилась в пределах величин, установленных другими авторами. Устойчивыми к АМВ считали грибы, для которых значения МПК были $\geq 2,0$ мкг/мл, чувствительными — с МПК $\leq 1,0$ мкг/мл [27]. В соответствии с этими критериями грибы штамма *C.albicans* CCM885 и изолята *C.albicans* №59 были устойчивы к АМВ, изолята *C.lusitaniae* №69 — чувствительны, а изолята *C.albicans* №71 — умеренно чувствительны (МПК 1,56 мкг/мл).

Исследование было посвящено выяснению возможности комбинированного применения АМВ и мирамистина для подавления роста грибов рода *Candida*, имеющих устойчивость к одному или обоим препаратам одновременно. На момент проведения исследований не было ясно, можно ли достичь синергетического антифунгального эффекта при комбинированном применении полиеновых антибиотиков и антисептиков, относящихся к катионным четвертичным аммониевым соединениям, к которым принадлежит мирамистин. Против этого свидетельствовали данные E. Scheibler и соавт. [11], выявивших антагонизм между полиеновым антибиотиком нистатином и катионным антисептиком хлоргексидином при изучении их комбинированного действия на грибы *C.albicans* ATCC 18804.

Для оценки антифунгального действия мирамистина в настоящей работе использовалась модифицированная методика, основанная на определении скорости инактивации грибов антисептиком в среде, не содержащей органических соединений [24]. Альтернативные способы определения воздействия антисептиков на микроорганизмы базируются на определении МПК препарата при длительной 48-часовой инкубации грибов в присутствии антисептика в среде [2, 10]. На наш взгляд, в условиях реального практического применения препарата в лечебных целях столь длительное поддержание стабильной концентрации антисептика в инфицированных средах человеческого тела является маловероятным. Поэтому было решено оценивать действие мирамистина на грибы по скорости их инактивации в воде при инкубации микроорганизмов в присутствии антисептика в пределах не более одного часа. Ранее такой подход был реализован C. Fromm-Dornieden и соавт. [14], для исследования инактивации мирамистином бактерий *S.aureus*, *E.coli* и *Paeruginosa* при 30-минутной инкубации микроорганизмов с антисептиком.

В нашей работе определение действия препаратов по скорости инактивации грибов использовали для решения двух задач: для определения устойчивости грибов к мирамистину и для выявления синергетического антифунгального действия мирамистина и АМВ. Для решения первой задачи устойчивыми к мирамистину считали грибы, имевшие выживаемость более 15, 5 и 0% после 15, 30 и 60 мин инкубации, соответственно, в присутствии 0,01% раствора мирамистина. В соответствии с этими критериями устойчивыми к антисептику были два изолята (*C.albicans* №59, *C.lusitaniae* №69), а остальные два — чувствительными. Для решения второй задачи мирамистин брали в сублетальной 0,001% концентрации, которая была в три раза меньше минимальной бактерицидной концентрации антисептика для *S.aureus*, проявившего при 30-минутной инкубации наибольшую чувствительность к препарату [14]. При этом полагали, что в случае существенного подавления жизнедеятельности грибов комбинациями мирамистина и АМВ, взятыми в сублетальных концентрациях, говорить можно будет не о простой суммации эффектов этих препаратов, а об их синергетическом действии.

Полученные результаты показали, что при комбинированном применении мирамистина и АМВ не наблюдалось того антагонистического взаимодействия катионных детергентов и полиеновых антибиотиков, которое было описано другими авторами (E. Scheibler и соавт. [11]) по результатам изучения сочетанного действия хлоргексидина и нистатина на *C.albicans*. Напротив, при комбинированном применении 0,001% ми-

рамистина и АМВ в концентрациях 10 и 50 мкг/мл происходило угнетение роста всех изученных грибов. В случаях комбинированного использования мирамистина и АМВ в концентрации 50 мкг/мл в течение 15 мин полностью подавлялась жизнеспособность половины культур, а через 30 и более минут — всех исследованных грибов. При этом препараты, взятые отдельно (за исключением 50 мкг/мл АМВ), не подавляли роста микроорганизмов. Только АМВ в концентрации 50 мкг/мл инактивировал *C.albicans* №59 при 60-минутной инкубации. Неожиданным оказалось то, что этот изолят, устойчивый к мирамистину и АМВ в индивидуальной форме, оказался более чувствительным к их комбинированному действию, чем другие грибы, устойчивые только к одному из препаратов. В отличие от других грибов жизнеспособность *C.albicans* №59 подавлялась полностью уже при 15-минутном комбинированном действии мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл. При 30-минутном комбинированном действии, если АМВ брали в концентрации 10 мкг/мл, происходило полное подавление роста трёх культур грибов. Выживали только грибы изолята *C.albicans* №71, чувствительные к каждому отдельному препарату. Таким образом, наиболее устойчивыми к комбинированному воздействию мирамистина и АМВ оказались грибы рода *Candida*, чувствительные к обоим препаратам при их раздельном применении, а наиболее чувствительными — грибы, устойчивые к препаратам при их раздельном применении.

Литература/References

1. Ахапкина И.Г., Глушакова А.М., Родионова Е.Н., Качалкин А.В. Эффективность антифунгальных препаратов в отношении грибов рода *Candida*, выделенных в Московском регионе. Антибиотики и химиотер. 2020; 65 (3–4): 16–22. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-16-22>. [Akhapkina I.G., Glushakova A.M., Rodionova E.N., Kachalkin A.V. The Effectiveness of antifungal agents against yeasts of *Candida* genus isolated in Moscow Region. Antibiotiki i khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2020; 65 (3–4): 16–22. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-16-22>. [in Russian]
2. Osmanov A., Wise A., Denning D.W. *In vitro* and *in vivo* efficacy of miramistin against drug-resistant fungi. J. Med. Microbiol. 2019; 68 (7): 1047–1052. doi: 10.1099/jmm.0.001007.
3. Farmakiotis D., Kontoyiannis D.P. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. Int J Antimicrob Agents. 2017; 50: 318–324. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.019.
4. Van Dijk P., Sjollem J., Cammue B.P.A., Lagrou K., Berman J., d'Enfert C. et al. Methodologies for *in vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. Microbial Cell. 2018; 5 (7): 300–326. doi: 10.15698/mic2018.07.638.
5. Thevissen K. How promising are combinatorial drug strategies in combating *Candida albicans* biofilms? Future Med Chem. 2016; 8: 1383–1385. doi: 10.4155/fmc-2016-0127.
6. Hill J.A., Cowen L.E. Using combination therapy to thwart drug resistance. Future Microbiol. 2015; 10 (11): 1719–26. doi: 10.2217/fmb.15.68
7. Jezikova Z., Pagac T., Viglas J., Pfeiferova B., Soltys K., Bujdakova H., et al. Synergy over monotherapy. Curr Microbiol. 2019; 76 (6): 673–677. doi: 10.1007/s00284-019-01678-9.
8. Gao M., Wang H., Zhu L. Quercetin assists fluconazole to inhibit biofilm formations of fluconazole-resistant *Candida albicans* in *in vitro* and *in*

Сопоставление средних значений оптической плотности грибов, выросших после контакта с препаратами, показало, что комбинированное использование 0,001% мирамистина и АМВ в концентрации 10 мкг/мл при всех сроках инкубации приводило к значительному достоверному подавлению роста грибов. Каждый отдельный препарат в указанных концентрациях не ингибировал их роста. Это, по нашему мнению, свидетельствовало о том, что данная комбинация мирамистина и АМВ обладает синергетической антифунгальной активностью в отношении устойчивых к отдельным препаратам грибов, которая существенно превосходит простую сумму эффектов этих веществ. Однако при 30–60-минутной инкубации грибов с АМВ в концентрации 50 мкг/мл этот полиен проявлял свою индивидуальную активность: различия в антифунгальном действии АМВ при его отдельном и комбинированном с мирамистином применении становились недостоверными.

Таким образом, комбинированное действие 0,001% мирамистина и амфотерицина В на устойчивые к указанным препаратам грибы рода *Candida* демонстрирует синергетический антифунгальный эффект препаратов, если АМВ используется в концентрации 10 мкг/мл. В случае использования комбинации препаратов с концентрацией АМВ 50 мкг/мл, при которой проявляется его собственный антифунгальный эффект, нельзя исключить того, что противогрибковое действие такой смеси может сводиться к простой сумме эффектов её отдельных компонентов.

in vivo antifungal managements of vulvovaginal candidiasis. Cell Physiol Biochem. 2016; 40 (3–4): 727–724. doi: 10.1159/000453134.

9. Fathilah A.R., Himratul-Aznita W.H., Fatheen A.R.N., Suriani K.R. The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. J Dent. 2012; 40 (7): 609–615. doi: 10.1016/j.jdent.2012.04.003.
10. Reginato C.F., Bandeira L.A., Zanette R.A., Santurio J.M., Alves S.H., Danesi C.C. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against *Candida dubliniensis* before and after *in vitro* fluconazole exposure. Rev Soc Bras Med Trop. 2017; 50 (1): 75–79. doi: 10.1590/0037-8682-0461-2016.
11. Scheibler E., da Silva R.M., Leite C.E., Campos M.M., Figueiredo M.A., Salum E.G. et al. Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of *Candida albicans*. Arch Oral Biol. 2018; 89: 70–76. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.02.009.
12. Chandra S.S., Miglani R., Srinivasan M.R., Indira R. Antifungal efficacy of 5.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA with and without an antifungal agent. J Endod. 2010; 36 (4): 675–678. doi: 10.1016/j.joen.2010.01.015.
13. Agafonova M.N., Kazakova R.R., Lubina A.P., Zeldi M.I., Nikitina E.V., Balakin K.V. et al. Antibacterial activity profile of miramistin in *in vitro* and *in vivo* models. Microb Pathog. 2020; 142: 104072. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104072.
14. Fromm-Dornieden C., Rembe J.D., Schafer N., Bohm J., Stuermer E.K. Cetylpyridinium chloride and miramistin as antiseptic substances in chronic wound management — prospects and limitations. J Med Microbiol. 2015; 64 (Pt 4): 407–414. doi: 10.1099/jmm.0/000034.
15. Hatipoglu N., Hatipoglu H. Combination antifungal therapy for invasive fungal infections in children and adults. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2013; 11 (5): 523–535. doi: 10.1586/eri.13.29.
16. Baddley J.M., Poppas P.G. Antifungal combination therapy. Drugs 2005; 65: 1461–1480. doi: 10.2165/00003495-200565110-00002.
17. Felipe L.O., Junior W.E.D.S., Araujo K.C., Fabrin D.L. Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia—natural products that show promise in can-

- didiasis treatment. *Braz.J.Microbiol.* 2018; 49 (2): 212–219. doi: 10.1016/j.bjm.2017.05.008.
18. Zhou Y., Wang G., Li Y., Liu Y., Song Y., Zheng W. et al. *In vitro* interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C.parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (6): 3250–3260. doi: 10.1128/AAC.06082-11.
 19. You J.L., Du L., King J.B., Hall B.E., Cichewicz R.H. Small-molecule suppressors of *Candida albicans* biofilm formation synergistically enhance the antifungal activity of amphotericin B against clinical *Candida* isolates. *ACS Chem Biol.* 2013; 8 (4): 840–848. doi: 10.1021/cb400009f.
 20. Khan M.S.A., Malik A., Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2012; 50 (1): 33–34. doi: 10.3109/13693786.2011.582890.
 21. Di Vito M., Mattarelli P., Modesto M., Girolamo A., Ballardini M., Tamburro A. et al. *In vitro* activity of tea tree oil vaginal suppositories against *Candida* spp. and probiotic vaginal microbiota. *Phytother Res.* 2015; 29 (10): 1628–1633. doi: 10.1002/ptr.5422.
 22. Venkatesh M., Rong L., Raad I., Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 936–944. doi: 10.1099/jmm.0.009761-0.
 23. Oliveira dos Santos C., Kalwijck E., van der Lee H.A., Tehupeiory-Kooreman M.C., Al-Hatmi A.M.S., Matayan E. et al. *In vitro* activity of chlorhexidine compared with seven antifungal agents against 98 *Fusarium* isolates recovered from fungal keratitis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (8): e02669–18. doi: 10.1128/AAC.02669-18.
 24. Brady A., Loughlin R., Gilpin D., Kearney P., Tunney M. *In vitro* activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of methicillin-resistant and — sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. *J Med Microbiol.* 2006; 55 (Pt 10): 1375–1380. doi: 10.1099/jmm.0.46558-0.
 25. Pfaller M.A., Bale M., Buschelman B., Lancaster M., Espinel-Ingroff A., Rex J.H. et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth microdilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (5): 1104–1107. doi: 10.1128/JCM.33.5.1104-1107.1995.
 26. Cui J., Ren B., Tong Y., Dai H., Zhang L. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence* 2015; 6(4): 362–371. doi: 10.1080/21505594.2015.1039885
 27. Yang Y.L., Li S.Y., Cheng H.H., Lo H.J. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 99–103. doi: 10.1186/1471-2334-5-99.

Информация об авторах

Кирсанова Марина Александровна — к. б. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID: 0000-0001-5559-005

Криворутченко Юрий Леонидович — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID:0000-0003-1380-983X

Постникова Ольга Николаевна — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID: 0000-0003-2113-4107

Андроновская Ирина Борисовна — к. б. н., доцент; доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Медицинской академии им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Минобрнауки России, Симферополь, Россия. ORCID: 0000-0001-9053-1785

About the authors

Marina A. Kirsanova — Ph. D. in Biology, Associate Professor at the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0001-5559-005

Yuri L. Krivorutchenko — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0003-1380-983X

Olga N. Postnikova — Senior Lecturer of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0003-2113-4107

Irina B. Andronovskaja — Ph. D. in Biology, Associate Professor; Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Simferopol, Russia. ORCID:0000-0001-9053-1785

Противовирусная активность комбинации интерферона альфа-2b и таурина *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2

Н. П. КАРТАШОВА¹, А. В. ИВАНИНА¹, Е. А. ГЛУБКОВА¹,
И. Н. ФАЛЫНСКАЯ¹, А. А. ПОРОМОВ^{1,2}, *И. А. ЛЕНЕВА¹

¹ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Antiviral Activity of Interferon Alpha-2b and Taurine Combination Against SARS-CoV-2 *in vitro*

NADEZHDA P. KARTASHOVA¹, ANNA V. IVANINA¹, EKATERINA A. GLUBKOVA¹,
IRINA N. FALYNSKOVA¹, ARTEM A. POROMOV^{1,2}, *IRINA A. LENEVA¹

¹ Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

² The Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Резюме

Интерфероны (ИФН) проявляют высокую противовирусную активность в отношении многих вирусов, в том числе коронавируса SARS-CoV-2. В РФ широко применяется комбинация ИФН-α2b и антиоксиданта таурина. Противовирусная активность данной комбинации в отношении SARS-CoV-2 ранее не изучалась. Цель исследования — изучение противовирусной активности лекарственных препаратов интерферона в комбинации с таурином и без него. Исследование включало последовательное изучение цитотоксичности и противовирусной активности готовых лекарственных форм препаратов ИФН-α2b, при хранении согласно инструкции при 2–8°C и после хранения в течение 1 мес. в условиях комнатной температуры (20–26°C) в предварительно вскрытом состоянии. Комбинация ИФН альфа-2b с таурином обладает более высокой противовирусной активностью по сравнению с монопрепаратом ИФН альфа-2b, больше чем на 25% при «низкой» множественности заражения и 85% — при высокой. Индекс селективности для комбинаций ИФН-α2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг/мл) и ИФН-α2b (10 000 МЕ/мл) + таурин (0,8 мг/мл) составил более чем 600 ед., для препарата ИФН-α2b (10 000 МЕ/мл) составил 200 ед. Противовирусная активность препаратов после одного месяца хранения при комнатной температуре не изменяется. По уровню токсичности комбинация интерферона с таурином при высоких концентрациях менее токсична, чем интерферон. Полученные результаты обосновывают применение комбинаций интерферона альфа-2b и таурина как для лечения, так и профилактики COVID-19.

Ключевые слова: вирусы; интерферон; противовирусная активность; токсичность

Для цитирования: Карташова Н. П., Иванина А. В., Глубкова Е. А., Фалынская И. Н., Поромов А. А., Ленева И. А. Противовирусная активность комбинации интерферона альфа-2b и таурина *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 35–41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-35-41>.

Abstract

Interferons (IFN) have antiviral activity against many viruses, including SARS-CoV-2. A combination of IFN-α2b and the antioxidant taurine is widely used in the Russian Federation, and its antiviral activity has not been studied before. The aim of this study was to determine the antiviral activity of interferon drugs, in combination with taurine and without it. The study included cytotoxicity and antiviral activity assays of IFN-α2b preparations, when stored according to the instructions at 2–8°C, and after 1 month storage at the temperature of 20–26°C in a pre-opened state. The combination of IFN alpha-2b with taurine has a higher antiviral activity compared to IFN alpha-2b mono-preparation by more than 25% at a «low» and 85% at a «high» multiplicity of infection. Selectivity index for combinations of IFN-α2b (50,000 IU/dose) + taurine (1 mg/ml) and IFN-α2b (10,000 IU/ml) + taurine (0.8 mg/ml) was more than 600 units, whereas for the IFN-α2b (10,000 IU/ml) it was 200 units. Antiviral activity does not change after one month at room temperature. The combination of interferon with taurine at high concentrations was less toxic than interferon. The results obtained demonstrate practicability of interferon alpha-2b and taurine combination use for treatment and prevention of COVID-19.

Keywords: hydrogen peroxymonosulfate; ampicillin; spectrophotometry; voltammetry; redox titration

For citation: Kartashova N. P., Ivanina A. V., Glubkova E. A., Falynskaya I. N., Poromov A. A., Leneva I. A. Antiviral activity of interferon alpha-2b and taurine combination of against SARS-CoV-2 *in vitro*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 9–10: 35–41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-35-41>.

Введение

Поиск эффективных способов лечения и профилактики COVID-19 остаётся открытым, несмотря на более чем два года изучения как самого коронавируса SARS-CoV-2, так и разработки вакцин и лекарственных препаратов. Вакцинопрофилактика COVID-19, считавшаяся основным способом контроля заболеваемости, столкнулась с появлением новых вариантов вируса [1] и недоступностью вакцины для части населения Земли, что не позволяет обеспечить достаточный уровень охвата вакцинации. Кроме того, появление новых вариантов вируса SARS-CoV-2, способных уклоняться от постинфекционного и вакцинального иммунитета, и действия моноклональных антител, в сочетании с относительно коротким периодом сохранения иммунитета у многих реципиентов приводит к новым всплескам заболевания [1–3].

Поэтому, доступность эффективных и безопасных противовирусных препаратов для профилактики и лечения COVID-19 имеет решающее значение, однако этот вопрос остаётся открытым. В Российской Федерации в соответствии с рекомендациями Министерства Здравоохранения (версия 16 от 18.08.2022) в качестве этиотропной противовирусной терапии для лечения COVID-19 применяются: фавипиравир, молнупиравир, нирматрелвир+ритонавир, ремдесивир, умифеновир и рекомбинантный интерферон альфа (ИФН- α). Однако последние клинические исследования не подтвердили влияние фавипиравира на прогрессирование COVID-19 и продолжительность выделения вируса [4]. По результатам исследования «SOLIDARITY», ВОЗ опубликовало условную рекомендацию против использования ремдесивира [5], а ряд препаратов, такие как гидроксихлорохин и ритонавир + лопинавир уже давно исключены из рекомендаций.

ИФН- α одним из первых был включен в рекомендации. В самых разных лекарственных формах ИФН- α в РФ и мировой практике используется для лечения вирусных инфекций, онкологических и других заболеваний. В РФ наиболее широко применяется ИФН- α для интраназального введения, применение которого с начала пандемии возросло более чем на 250% (по данным статистических отчётов ООО «АЛЬФА РЕСЕРЧ И МАРКЕТИНГ») и продолжает расти.

Важность интерферонов в реализации противовирусного ответа при COVID-19 неоднократно подчёркивалась во многих исследованиях. Результаты серии анализов, сделанных в разные периоды заболевания у людей, выявили чёткую зависимость продукции ИФН- α от тяжести течения болезни. У пациентов с лёгкой и средней степенью тяжести наблюдался стабильный высокий уровень ИФН- α , у тяжёлых пациентов — высокий уровень ИФН- α с коротким периодом поддержа-

ния в крови, а у критических — низкий уровень или полное отсутствие ИФН- α [6]. Обнаружено, что вирус SARS-CoV-2 обладает способностью подавлять производство интерферона организмом. При тяжёлом течении наблюдается дефицит ИФН- α , поэтому наиболее тяжёлые случаи связаны с нарушенной выработкой ИФН- α [7].

Клинические исследования применения ИФН- α с участием пациентов с COVID-19 лёгкой и средней степени тяжести показали, что ИФН- α способствует сокращению времени до выздоровления и скорости элиминации вируса, а интраназальный путь введения обеспечивает преимущество перед другими лекарствами благодаря своей простоте [8].

Противовирусная активность ИФН- α 2b в отношении вируса SARS-CoV-2 ранее уже изучалась, в том числе и в РФ [9]. Помимо препаратов ИФН- α 2b в РФ зарегистрирована комбинация ИФН- α 2b и антиоксиданта таурина, которая также нашла широкое применение в РФ, а применение с начала пандемии возросло более чем на 700%. Данные по противовирусной активности таурина в отношении SARS-CoV-2 ограничены, однако показана активность таурина в отношении многих респираторных вирусов [10], а его производных — в том числе и против SARS-CoV-2 [11]. Тем не менее, противовирусная активность в отношении SARS-CoV-2 комбинации ИФН- α 2b и таурин ранее не изучалась и исследована впервые в данной работе.

Цель исследования — изучение противовирусной активности лекарственных препаратов интерферона в комбинации с таурином и без него. Исследование включало последовательное изучение цитотоксичности и противовирусной активности готовых лекарственных форм препаратов ИФН- α 2b при хранении согласно инструкции при 2–8°C и после хранения в течение 1 мес. в условиях комнатной температуры (20–26°C) в предварительно вскрытом состоянии.

Материал и методы

Исследуемые препараты:

1. Генферон Лайт спрей назальный дозированный (ЗАО «БИОКАД»), интерферон альфа-2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг /мл).
2. Генферон Лайт капли назальные (ЗАО «БИОКАД»), интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл) + таурин (0,80 мг/мл).
3. Гриппферон, капли назальные (ООО ФИРН-М), интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл).

Рабочие растворы препаратов готовились из расчёта содержания чистой субстанции в лекарственной форме непосредственно перед применением.

Перед проведением экспериментов использовали 2 схемы хранения препаратов. Первая — хранение в соответствии с инструкцией по медицинскому применению в холодильнике при температуре 2–8°C. Вторая — имитация хранения в домашних условиях после первого использования: хранение в течение 30 дней в условиях комнатной температуры 20–26°C в предварительно вскрытом состоянии (препа-

раты были открыты, сняты пластиковая крышка и алюминиевая обкатка, надета насадка-капельница, проверена возможность дозирования и далее надет защитный колпачок).

Вирус и клетки. В работе использовался лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2: Dubrovka (идент. № GenBank: MW514307.1, классификация по Rango B.1.1.317, филогенетически близкий к штамму «Wuhan-Hu-1, идент. № GenBank: MN908947.3), далее Dubrovka. Вирус был выделен и любезно предоставлен Е. Б. Файзолуевым. Штамм был выделен на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного с подтверждённым диагнозом COVID-19, прошёл 20 последовательных пассажей и вызывал выраженное ЦПД. Культивирование вируса проводили на клетках эпителия почки африканской зелёной марышки Vero CCL81 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И. И. Мечникова (далее — культура клеток Vero) при 37°C в питательной среде DMEM с L-глутамином (300 мкг/мл) и глюкозой 4,5 г/л, смесью антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂.

Образцы вирусного материала для проведения работы хранились при температуре –80°C.

Определение цитотоксического действия. Оценку цитотоксического действия проводили по стандартной методике с использованием МТТ (тиазолил голубой). Планшеты инкубировали 5 сут при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Каждая концентрация оценивалась в 4 повторностях (n=4). В качестве отрицательного контроля были использованы клетки, содержащие 200 мкл питательной среды.

Определение противовирусной активности. Культуру клеток Vero CCL81 вносили в 96-луночные планшеты (20 000 клеток/луночку). На 3-и сутки, после достижения полного монослоя из лунок планшета удаляли ростовую среду с последующим внесением 100 мкл исследуемых соединений в 2-кратных концентрациях. Каждую из семи исследуемых концентраций вносили в двух опытах в четырёх повторностях (n=8), также оценивали по 8 лунок клеточного контроля (содержащие 200 мкл питательной среды) и вирусного контроля (без внесения препаратов). После инкубации в течение 2 ч во все лунки, за исключением лунок клеточного контроля, вносили вирус при низкой 20 или высокой 100 MOI (в 100 мкл), и клетки инкубировали в течение 5 суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до появления чёткого цитопатического действия (ЦПД) в клетках вирусного контроля. Учёт результата проявления ЦПД в клетках проводится с использованием количественного теста МТТ.

Процент ингибирования определяли по формуле [12]:

$$\text{Ингибирование, \%} = 100 - \frac{(\text{ОП}_{\text{кл. контроль}} - \text{ОП}_{\text{опыт}})}{(\text{ОП}_{\text{кл. контроль}} - \text{ОП}_{\text{вир. контроль}})} \times 100$$

Анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MS Excel и пакета RStudio (version 1.3.1093). Оценку цитотоксического действия (ЦТД₅₀) и ингибирующих концентраций (ИК₅₀) рассчитывали с помощью пакета «drc» на основе анализа четырёхпараметрической логистической модели зависимости «доза-ответ». Достоверность разницы выживаемости обработанных препаратами клеток с клеточным контролем определяли с использованием критерия Крускала-Уоллиса, при множественных сравнениях использовали тест Даннета. При использовании статистических процедур различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Цитотоксическое действие. Цитотоксическое действие исследуемых растворов изучали в диапазоне концентраций интерферона от 0,001 до 10⁴ МЕ/мл. После инкубации исследуемых растворов в течение 5 сут предварительная визуальная оценка не показала цитотоксических и мор-

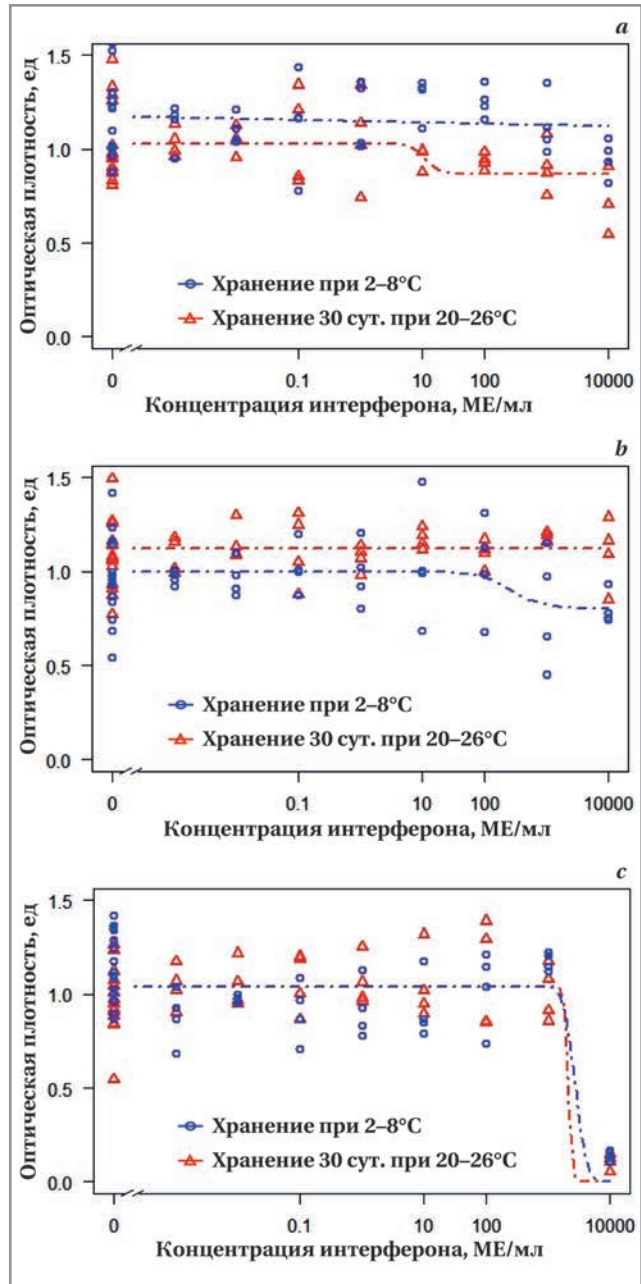


Рис. 1. Цитотоксичность препаратов интерферона альфа-2b в культуре клеток Vero CCL81, МТТ тест.

a — ИФН-α2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг/мл); b — ИФН-α2b (10 000 МЕ/мл) + таурин (0,8 мг/мл); c — ИФН-α2b (10 000 МЕ/мл)

Примечание. ○ — хранение при температуре 2–8°C (синий); △ — хранение в течение 30 дней в условиях комнатной температуры 20–26°C (красный, пунктирная линия). p — сравнение двух нелинейных моделей (ANOVA). ЦТД₅₀ — для обеих моделей.

Fig. 1. Cytotoxicity of interferon alpha-2b preparations in Vero CCL81 cell culture, MTT test.

a — interferon alpha-2b (50,000 IU/dose) + taurine (1 mg/ml); b — interferon alpha-2b (10,000 IU/ml) + taurine (0.80 mg/ml); c — interferon alpha-2b (10,000 IU/ml).

Note. ○ — storage at a temperature of 2–8°C (blue); △ — storage for 30 days at room temperature 20–26°C (red, dotted line). p — comparison of two non-linear models (ANOVA). CTA₅₀ — for both models.

Противовирусная активность в отношении вируса SARS-CoV-2 и цитотоксичность препаратов интерферона альфа-2b в комбинации с таурином и без в культуре клеток Vero CCL81 в зависимости от условий хранения
Antiviral activity and cytotoxicity of interferon alpha-2b preparations in combination with taurine and without it against the SARS-CoV-2 virus in Vero CCL81 cell culture depending on storage conditions

Препарат	Условия хранения	ЦТД ₅₀ , МЕ/мл	ИК ₅₀ , МЕ/мл		ИС*	
			100 MOI	20 MOI	100 MOI	20 MOI
ИФН-α2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг/мл)	4°C	>10 ⁴	15,4±6,3	14,5±5,5	>600	>600
	RT	>10 ⁴	107,9±23,3	40,0±21,1	>100	>250
ИФН-α2b (10 000 МЕ/мл) + таурин (0,8 мг/мл)	4°C	>10 ⁴	>10 ³	14,2±13,7	10	>600
	RT	>10 ⁴	>10 ³	92,9±49,5	10	>100
ИФН-α2b (10 000 МЕ/мл)	4°C	5×10 ³	н. а.	25±9	—	200
	RT	5×10 ³	н. а.	34±58	—	145

Примечание. 4°C — препарат хранился при 2–8°C; RT — после хранения в течение 1 мес. в условиях комнатной температуры (20–26°C) в открытом состоянии; ИС* — индекс селективности, определялся как отношение ЦТД₅₀ к ИК₅₀; н. а. — нет активности.

Note. 4°C — the drug was stored at 2–8°C; RT — after storage for 1 month at room temperature (20–26°C) in the open state; ИС* — selectivity index, determined as the ratio of CTA₅₀ to IC₅₀; N.A. — no activity.

фологических изменений, а также нарушений монослоя в клеточном контроле.

В экспериментальных лунках со всеми изучаемыми препаратами, содержащими комбинацию интерферона альфа-2b и таурин, не было отмечено значительных отличий от клеточного контроля при визуальной оценке монослоя клеток Vero CCL81. В то же время в лунках, в которые был добавлен интерферон альфа-2b в концентрации 1000 и 10 000 МЕ/мл, наблюдалось частичное или полное разрушение клеток. Проведённые исследования с использованием более точного количественного метода с окрашиванием клеток подтвердили данные, полученные при визуальном изучении состояния клеток. Результаты оценки цитотоксичности в МТТ-тесте представлены на рис. 1 и в таблице.

Жизнеспособность клеток Vero CCL81 при добавлении к ним комбинаций интерферона альфа-2b и таурина в концентрациях от 0,001 МЕ/мл до 10⁴ МЕ/мл не отличалась значительно от таковой в клеточном контроле. Значения ЦТД₅₀ превышали 10⁴ МЕ/мл. Жизнеспособность клеток Vero CCL81 при добавлении к ним интерферона альфа-2b в концентрации 10⁴ МЕ/мл была значительно снижена 80–90%, ЦТД₅₀ можно оценить на уровне 5×10³ МЕ/мл.

При сравнении кривых цитотоксичности не было различий при разных условиях хранения ($p > 0,05$, ANOVA), значимого влияния условий хранения или усиления токсичности при хранении в комнатных условиях в течение 30 дней не наблюдали.

Противовирусная активность. Изучение противовирусного действия препаратов интерферона альфа-2b в культуре клеток Vero CCL81 в отношении коронавируса SARS-CoV-2 было проведено методом ингибирования ЦПД вируса, выявляемого окрашиванием в тесте МТТ. Для заражения клеток использовали две множественности заражения — «низкую» 20 MOI и «высокую» 100 MOI. Было проведено два независимых опыта, для

каждой точки опыта использовали 4 лунки повтора. Противовирусную активность интерферона альфа-2b изучали в диапазоне концентраций интерферона от 0,001 до 10⁴ МЕ/мл.

Противовирусная активность исследуемых препаратов в максимальной нетоксичной дозировке, нормированной по содержанию интерферона альфа-2b в дозе 1000 МЕ/мл, не зависит от условий хранения, воспроизведённых в данном исследовании (рис. 2). Различий между одноимёнными препаратами с разными условиями хранения ни в одной из пар при обоих множественностях заражения не наблюдалось ($p \geq 0,05$, Kruskal Wallis test).

Наибольшая выживаемость клеток после заражения вирусом SARS-CoV-2 достигается в первой группе при добавлении комбинации «интерферон альфа-2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг/мл)» вне зависимости от множественности заражения, что значительно выше, чем выживаемость в других исследуемых группах. Особенно это проявляется при множественности заражения 100 MOI. Так, в условиях хранения при 2–8°C выживаемость клеток после заражения снижается с 78±8 до 49±6% ($p_{1,2}=0,01$, Kruskal Wallis post-hoc Dunn's test) и 10±1% ($p_{1,3}=0,0001$, $p_{2,3}=0,04$), соответственно, для группы «интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл) + таурин (0,80 мг/мл)» и «интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл)». При множественности заражения 20 MOI различий противовирусной активности между группами не наблюдается ($p \geq 0,05$), выживаемость варьирует от 90 до 60%.

Далее противовирусная активность рассчитывалась для растворов исследуемых препаратов в разведении от 10 до 20×10⁷ раз, результаты представлены на рис. 3. Выживаемость клеток между исследуемыми препаратами различается как при 20 MOI (ANOVA: $p=0,0001$, $F=5,56$), так и при 100 MOI (ANOVA: $p=0,01$, $F=2,01$). Наибольшая выживаемость отмечается для комбинации интерферон альфа-2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг/мл).

Полученные результаты при «низкой» множественности заражения свидетельствуют о рав-

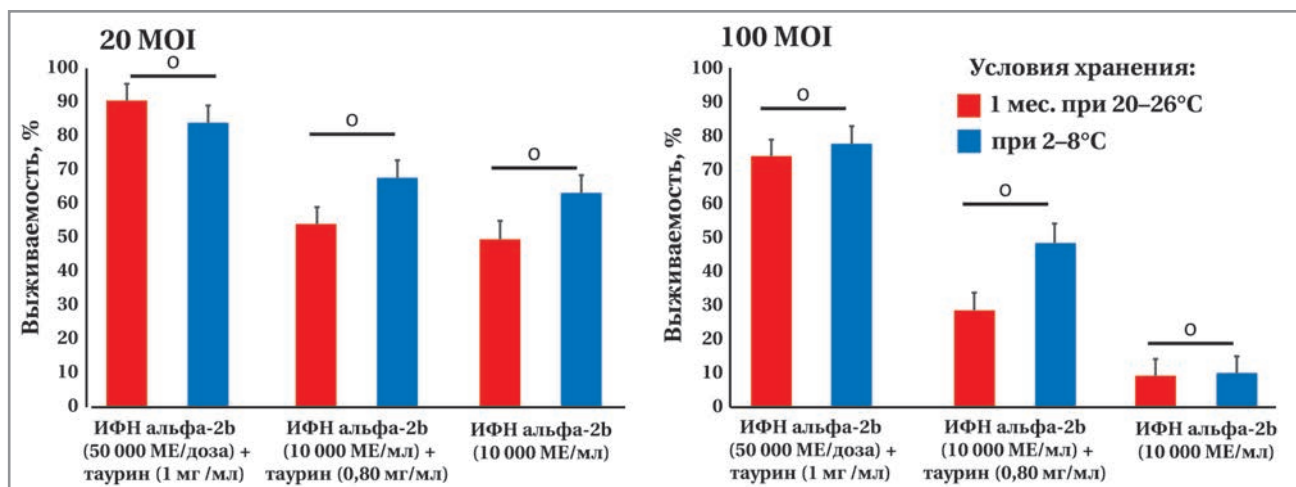


Рис. 2. Противовирусная активность препаратов интерферона альфа-2b в комбинации с таурином и без в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero CCL81 в зависимости от условий хранения.

Примечание. Концентрация интерферона 1000 МЕ/мл (максимальная концентрация, не приводящая к значительному снижению жизнеспособности клеток). Приведены значения p по результатам теста Крускала–Уоллиса при сравнении двух режимов хранения, о — $p \geq 0,05$. Среднее значение $\pm$ SE.

Fig. 2. Antiviral activity of interferon alpha-2b preparations in combination with taurine and without it against the SARS-CoV-2 virus in Vero CCL81 cell culture depending on storage conditions.

Note. The concentration of interferon 1,000 IU/ml (the maximum concentration that does not lead to a significant decrease in cell viability). The p values are given based on the results of the Kruskal–Wallis test when comparing two storage modes, o — $p \geq 0.05$. Mean $\pm$ SE.

ной противовирусной активности интерферона альфа-2b, однако при увеличении множественности заражения мы видим большую противовирусную активность за счёт её потенцирования таурином, причём данный эффект носит дозозависимый характер (см. рис. 2, MOI 100).

Добавление антиоксидантов препятствует окислительному разрушению молекул ИФН и способствует более длительному времени сохранению фармакологической активности лекарственного средства [13], и по-видимому снижению цитотоксического действия, что наблюдалось при сравнении цитотоксичности моно ИФН и комбинаций с таурином. При нарушении баланса перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты вследствие развития инфекционного заболевания происходит быстрая инактивация как эндогенного, так и экзогенного ИФН и, как следствие, нарушение противоинфекционной защиты организма.

Таурин, являясь антиоксидантом, может вносить вклад в реализацию противоинфекционной защиты организма. Активация инфекционного ответа сопровождается выделением значительного количества активных форм кислорода и хлора и развитием окислительного стресса в клетках. Таурин, действуя как общий антиоксидант, защищает клетки от аутофагоцитоза и чрезмерного воздействия свободных радикалов, в том числе, таурин может также защищать клетки эпителия дыхательных путей и лёгких путём снижения хлорирования клеточных компонентов [14].

Таурин и сам обладает противовирусной активностью. В ряде экспериментальных исследований продемонстрировано наличие у антиоксидантов противовирусной активности и иммуномодулирующих эффектов [15, 16].

Например, в исследовании А. А. Штро [10] была экспериментально изучена противовирусная активность рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b (ИФН альфа-2b) в комбинации с антиоксидантами (таурин и унитиол) в культуре клеток в отношении вируса гриппа и вируса простого герпеса человека. Таурин и унитиол обладали прямой противовирусной активностью, которая была более выраженной у таурина. Добавление антиоксидантов повышало уровень противовирусной активности ИФН альфа-2b. Максимальный индекс селективности был показан для комбинации ИФН альфа-2b с таурином, превосходящий ИФН альфа-2b в виде монопрепарата примерно в полтора раза в случае вируса гриппа и в шесть раз — в случае вируса герпеса. Это позволяет предполагать синергидное действие при сочетанном применении. В то же время по уровню токсичности антиоксиданты в виде монопрепаратов существенно не отличались от антиоксидантов в составе комбинаций с ИФН альфа-2b.

Препараты ИФН альфа-2b следует хранить в защищённом от света месте, при температуре 2–8°C, надлежащим условием для хранения данного вида препаратов являются холодильные камеры и отсутствие солнечного света. Однако

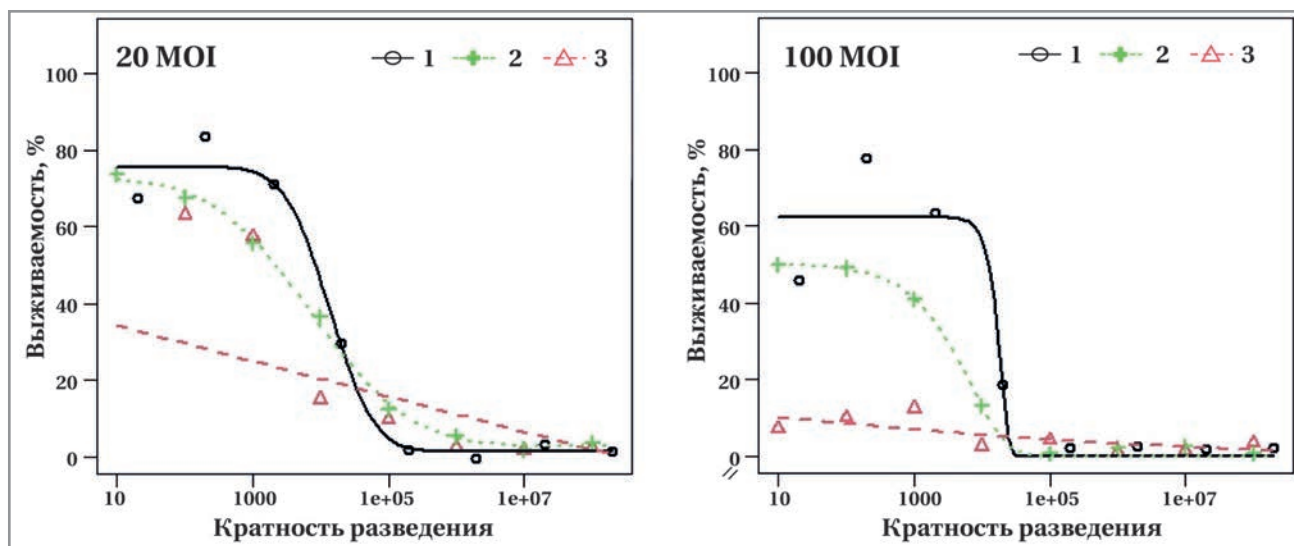


Рис. 3. Противовирусная активность препаратов интерферона в комбинации альфа-2b с таурином и без в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero CCL81.

Примечание. 1 — интерферон альфа-2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг /мл); 2 — интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл) + таурин (0,80 мг/мл); 3 — интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл); условия хранения при 2–8°C.

Fig. 3. Antiviral activity of interferon alpha-2b preparations in combination with taurine and without it against the SARS-CoV-2 virus in Vero CCL81 cell culture.

Note. 1 — interferon alpha-2b (50,000 IU/dose) + taurine (1 mg/ml); 2 — interferon alpha-2b (10,000 IU/ml) + taurine (0.80 mg/ml); 3 — interferon alpha-2b (10,000 IU/ml); storage at 2–8°C.

было показано, что при хранении в «комнатных» условиях уже вскрытого препарата противовирусная активность сохраняется.

Закключение

Комбинация интерферона альфа-2b с антиоксидантом таурином обладает более высокой противовирусной активностью по сравнению с монопрепаратом ИФН альфа-2b в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в среднем $\geq 25\%$ при «низкой» множественности заражения и 85% — при высокой. По уровню токсичности комбинация интерферона с таурином при высоких концентрациях была существенно менее токсичной, чем интерферон, который в свою очередь приводил

к практически полному разрушению монослоя клеток. Противовирусная активность препаратов после одного месяца при комнатной температуре не изменилась.

Результаты исследования могут быть использованы для подтверждения возможности применения комбинаций интерферона альфа-2b и таурина как для лечения, так и профилактики COVID-19, что в первую очередь обусловлено прямым противовирусным действием обоих компонентов в отношении большинства респираторных вирусов.

Исследование выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И. И. Мечникова.

Литература/References

1. Tao K., Tzou P.L., Nouhin J. et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet.* 2021; 22 (12): 757–773. doi: 10.1038/s41576-021-00408-x.
2. Chen R.E., Zhang X., Case J.B. et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nat Med.* 2021; 27 (4): 717–726. doi: 10.1038/s41591-021-01294-w.
3. Lucas C., Vogels C.B.E., Yildirim I. et al. Impact of circulating SARS-CoV-2 variants on mRNA vaccine-induced immunity. *Nature.* 2021; 600 (7889): 523–529. doi: 10.1038/s41586-021-04085-y.
4. Golan Y., Campos J.A.S., Woolson R. et al. Favipiravir in patients with early mild-to-moderate COVID-19: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis.* Published online September 6, 2022: ciac712. doi: 10.1093/cid/ciac712.
5. Agarwal A., Rochwerf B., Lamontagne F. et al. A living WHO guideline on drugs for COVID-19. *BMJ.* 2020; 370. doi: 10.1136/bmj.m3379.
6. Contoli M., Papi A., Tomassetti L. et al. Blood interferon- α levels and severity, outcomes, and inflammatory profiles in hospitalized COVID-19 patients. *Front Immunol.* 2021; 12: 648004. doi: 10.3389/fimmu.2021.648004.
7. Hadjadj J., Yatim N., Barnabei L. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020; 369 (6504): 718–724. doi: 10.1126/science.abc6027.
8. Kumar S., Saurabh M.K., Maharshi V. Efficacy and Safety of Interferon Alpha-2b in COVID-19: A Systematic Review. *Biomed Pharmacol J.* 2022; 15 (1): 27–32. doi: 10.13005/bpj/2340.
9. Loginova S.Y., Shchukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V. In vitro activity of human recombinant alpha-2b interferon against SARS-CoV-2 virus]. *Vopr Virusol.* 2021; 66 (2): 123–128. doi: 10.36233/0507-4088-13.
10. Штро А.А., Слута А.В., Карпинская Л.А., Галочкина А.В., Зарубаев В.В. Активность интерферона в комбинации с антиоксидантами против ДНК- и РНК-содержащих вирусов человека. *Лечащий врач.* 2012; 10: 52–56. [Shtro A.A., Sluta A.V., Karpinskaya L.A., Galochkina A.V., Zarubaev V.V. Aktivnost' interferona v kombinatsii s antioksidantami protiv DNK- i RНК-soderzhashchikh virusov cheloveka. *Lechashchij Vrach.* 2012; 10: 52–56. (in Russian)]
11. Lackner M., Rössler A., Volland A. et al. N-chlorotaurine is highly active against respiratory viruses including SARS-CoV-2 (COVID-19) *in vitro*. *Emerg Microbes Infect.* 2022; 11 (1): 1293–1307. doi: 10.1080/22221751.2022.2065932.

12. *Leneva I., Kartashova N., Poromov A. et al.* Antiviral activity of umifenovir *in vitro* against a broad spectrum of coronaviruses, including the novel SARS-CoV-2 virus. *Viruses*. 2021; 13 (8). doi: 10.3390/v13081665.
13. *Vasilyev A.N.* Antioxidant Impact on specific antiviral activity of human recombinant interferon α -2b with respect to herpes simplex in cell culture. *Antibiot Chemother*. 2010; 55 (7–8): 20–25.
14. *Rubio-casillas A., Gupta R.C., Redwan E.M., Uversky V.N., Badierah R.* Early taurine administration as a means for halting the cytokine storm progression in COVID-19 patients. *Explor Med*. 2022; 3 (3): 234–248. doi: 10.37349/emed.2022.00088.
15. *Morales-borges R.H., González M.J., Gupta R.C.* Taurine as Anticancer and Antiviral : Case Report and Prospective Update. *Glob J Cancer Case Reports*. 2020; 01 (02): 1–14.
16. *Ших Е.В., Дорофеева М.Н.* Рекомбинантный интерферон альфа -2b с антиоксидантами (альфа токоферола ацетат и аскорбиновая кислота): эффективность с точки зрения взаимодействия компонентов. *Педиатрия Журнал им ГН Сперанского*. Published online 2015: 149–155. [*Shikh E.V., Dorofeeva M.N.* Rekombinantnyj interferon al'fa-2b s antioksidantami (al'fa tokoferola atsetat i askorbinovaya kislota): effektivnost' s tochki zreniya vzaimodejstviya komponentov. *Pediatriya Zhurnal im GN Speranskogo*. Published online 2015: 149–155. (in Russian)]

Информация об авторах

Карташова Н. П. — м. н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва, Россия. ORCID 0000-0003-2096-5080

Иванина А. В. — лаборант-исследователь, лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва, Россия. ORCID 0000-0002-7289-693X

Глубокова Е. А. — м. н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва, Россия. ORCID 0000-0002-5925-9733

Фалынскова И. Н. — н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва, Россия. ORCID 0000-0001-9836-9620

Поромов А. А. — к. б. н., с. н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»; доцент Медицинского факультета РУДН, Москва, Россия. ORCID 0000-0002-2004-3935

Ленёва И. А. — д. б. н., заведующий лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва, Россия. ORCID 0000-0002-7755-2714

About the authors

Nadezhda P. Kartashova — Junior Researcher at the Laboratory of Experimental Virology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-2096-5080

Anna V. Ivanina — Laboratory Assistant and Researcher at the Laboratory of Experimental Virology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-7289-693X

Ekaterina A. Glubokova — Junior Researcher at the Laboratory of Experimental Virology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-5925-9733

Irina N. Falynskova — Researcher at the Laboratory of Experimental Virology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9836-9620

Artem A. Poromov — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Experimental Virology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; RUDN University, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2004-3935

Irina A. Leneva — D. Sc. in Biology, Head of the Laboratory of Experimental Virology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-7755-2714

Изучение противовирусной активности и фармакологической безопасности интраназальной формы двуспиральной рибонуклеиновой кислоты

*С. Г. ГАМАЛЕЙ, Г. Г. ШИМИНА, Е. С. ЦЫПЛЕНКОВА, О. В. СИМАКОВА, М. О. СКАРНОВИЧ, М. А. СКАРНОВИЧ, Л. Н. ШИШКИНА, О. С. ТАРАНОВ, О. С. ИВАНОВА, Г. М. ЛЕВАГИНА, Е. Д. ДАНИЛЕНКО

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Кольцово, Новосибирская область, Россия

Study on Antiviral Activity and Pharmacological Safety of Double-Stranded Ribonucleic Acid for Intranasal Administration

*SVETLANA G. GAMALEY, GALINA G. SHIMINA, ELENA S. TSYPLENKOVA, OLGA V. SIMAKOVA, MAXIM O. SKARNOVICH, MARIA A. SKARNOVICH, LARISA N. SHISHKINA, OLEG S. TARANOV, OLGA S. IVANOVA, GALINA M. LEVAGINA, ELENA D. DANILENKO

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Резюме

Препараты индукторов интерферона представляют интерес как препараты первой линии защиты при вирусных инфекциях, в том числе гриппе. В Институте медицинской биотехнологии — филиале ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана интраназальная форма препарата двуспиральной РНК (дсРНК), выбраны вспомогательные вещества и рецептура препарата. В данной работе представлены результаты изучения противовирусной активности и фармакологической безопасности новой лекарственной формы дсРНК. Исследование противовирусной активности препарата проведено на мышах BALB/c, инфицированных вирусами гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) или Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09), изучение безопасности — при однократном введении белым аутбредным мышам ICR. Исследование показало, что интраназальная форма дсРНК в дозе 2,5 мг/кг при лечебно-профилактической схеме применения повышает выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, инфицированных указанными штаммами вируса гриппа. Защитный эффект препарата на мышах, заражённых летальной дозой вируса Bishkek/01/2009, был сравним с эффектом препарата Тамифлю. Отсутствие токсического воздействия интраназальной формы дсРНК в фармакологической дозе на организм лабораторных мышей, состояние физиологических систем организма и основные виды обмена, установленное экспериментально, позволило сделать вывод о фармакологической безопасности и перспективности дальнейших работ по завершению фармацевтической разработки нового противовирусного лекарственного средства.

Ключевые слова: двуспиральная РНК; дсРНК; интраназальная форма; противовирусная активность; фармакологическая безопасность; вирус гриппа; мыши

Для цитирования: Гамалей С. Г., Шиминова Г. Г., Цыпленкова Е. С., Симакова О. В., Скарнович М. О., Скарнович М. А., Шишкина Л. Н., Таранов О. С., Левагина Г. М., Даниленко Е. Д. Изучение противовирусной активности и фармакологической безопасности интраназальной формы двуспиральной рибонуклеиновой кислоты. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 9–10: 42–48. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>.

Abstract

Interferon inducers are of interest as the first line of defense against viral infections, including influenza. Double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for intranasal administration has been developed, the excipients and drug components were selected at the Institute of Medical Biotechnology, a branch of the State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector». This work presents the results of the study on antiviral activity and pharmacological safety of a new form of dsRNA. The antiviral activity of the preparation was studied in BALB/c mice infected with influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) or Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09) viruses. A safety study was performed with a single administration of intranasal dsRNA into white outbred ICR mice. The study showed that the administration of therapeutic and prophylactic regimen of intranasal dsRNA at a dose of 2.5 mg/kg increases the survival and average life expectancy of mice infected with the mentioned strains.

of influenza virus. The protective effect of the preparation in mice infected with a lethal dose of Bishkek/01/2009 virus was comparable to the effect of Tamiflu. The absence of toxic effects of intranasal dsRNA at a pharmacological dose in laboratory mice, the functional state of their physiological systems, as well as main types of metabolism, established in the experiments, lead to a conclusion concerning pharmacological safety of the preparation and the prospects for further work to complete pharmaceutical development of a new antiviral drug.

Keywords: double-stranded RNA; intranasal dsRNA; antiviral activity; pharmacological safety; influenza virus; mice

For citation: Gamaley S. G., Shimina G. G., Tsyplenkova E. S., Simakova O. V., Skarnovich M. O., Skarnovich M. A., Shishkina L. N., Taranov O. S., Ivanova O. S., Levagina G. M., Danilenko E. D. Study on antiviral activity and pharmacological safety of double-stranded ribonucleic acid for intranasal administration. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 42–48. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>.

Введение

Эволюция вирусов гриппа, приводящая к появлению новых вирусных вариантов, высокий эпидемический потенциал гриппозной инфекции позволяют говорить о том, что поиск новых противовирусных препаратов по-прежнему не теряет своей актуальности. Учитывая значительную продолжительность разработки средств специфической профилактики и лечения, особый интерес в качестве лечебно-профилактических средств при возникновении новых вирусных вариантов представляют неспецифические средства противовирусной защиты, к которым относятся, в частности, индукторы интерферона. Двухспиральные РНК (дсРНК) принадлежат к особому классу индукторов, обладающих широчайшим спектром биологического действия. Первичный каскад ответных реакций организма на вирусное заражение и введение экзогенной дсРНК (узнавание, инициация внутриклеточных сигнальных путей) имеет много общего, что позволяет рассматривать эти соединения как естественные регуляторы противовирусных реакций [1]. В настоящее время на основе дсРНК разработан и зарегистрирован ряд препаратов преимущественно инъекционного применения (Амплиген, Ридостин, Полудан, Ларифан).

Учитывая, что «входными воротами» гриппозной инфекции являются слизистые, весьма привлекательный способ доставки активного вещества заключается в его трансмукозальном введении, в частности, интраназальном. Возможность локального воздействия активного вещества позволяет не только снизить величину эффективной дозы, но и как следствие — уменьшить возможные побочные эффекты препарата.

Ранее в Институте медицинской биотехнологии — филиале ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была разработана рецептура новой лекарственной формы дсРНК для интраназального применения, подобраны вспомогательные вещества, обеспечивающие стабильность её противовирусных свойств [2].

Цель исследования — изучение противовирусной активности новой интраназальной формы дсРНК на двух моделях гриппозной инфекции и оценка фармакологической безопасности препарата.

Материал и методы

Препараты. В экспериментах использовали препараты интраназальной формы дсРНК с содержанием субстанции дсРНК в двух дозировках: 1 мг/дозу (образец 1) и 0,5 мг/дозу (образец 2). Активный компонент препарата — субстанция дсРНК (Натриевая соль двухспиральной рибонуклеиновой кислоты, ФСП РН № 002021/01-07 04 20090769-08) представляла собой смесь дрожжевых одноцепочечных и двухспиральных РНК с содержанием дсРНК 20%. Состав интраназальной формы: субстанция дсРНК — 1 мг, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) — 0,05 мг, диметилсульфоксид — 0,05 мг, полиэтиленгликоль (ПЭГ-400) — 0,05 мг, натрия хлорид — 0,002 мг.

Препаратами сравнения служили:

— субстанция препарата Ридостин производства ООО «Диафарм» (г. Бердск Новосибирской области) с содержанием дсРНК 13,6%;

— противовирусный препарат, ингибитор нейраминидазы Тамифлю (Ля Рош Лтд., Швейцария);

— натрия хлорид буфус, растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций 0,9 % ЛПИ-005762/08 (далее — физиологический раствор);

— буфер для приготовления интраназальной формы препарата. Состав 1 флакона: ЭДТА — 0,05 мг, диметилсульфоксид — 0,05 мг, ПЭГ-400 — 0,05 мг, натрия хлорид 0,9% до 1 мл.

Вирусные модели. Для воспроизведения вирусной модели были использованы штаммы вируса гриппа (ВГ) А/Aichi/2/68 (H3N2) и А/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Экспериментальные животные. Исследование противовирусной активности препаратов проведено на 120 мышках обоего пола линии Balb/c возрастом 5 нед. с массой тела 15–18 г. Для изучения фармакологической безопасности использовали 60 белых аутбредных мышей ICR (CD-1), 30 самцов и 30 самок возрастом 7–8 нед. с массой тела 19–21 г. Животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р. п. Кольцово Новосибирской обл.).

Содержание мышей и эксперименты на них осуществляли в соответствии с российскими и международными требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [3–5].

Метод изучения противовирусной активности. Для оценки противовирусной активности препаратов было проведено две серии экспериментов. Животные в обеих сериях были распределены между экспериментальными группами случайным образом, по 10 особей в группе. В первом эксперименте мышам всех групп интраназально вводили ВГ А/Aichi/2/68 (H3N2), во втором — ВГ А/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09) в дозе 10 ЛД₅₀ в объёме 40 мкл суммарно в обе ноздри. Животным первой опытной группы вводили интраназальную форму дсРНК (образец 1) в дозе 2,5 мг/кг в объёме 25 мкл на мыш, второй опытной группы — интраназальную форму дсРНК (образец 2) в дозе 1,25 мг/кг в объёме 25 мкл на мыш. Животные третьей и четвертой групп (группы сравнения) получали интраназально раствор препарата Ридостин (субстанция) в эквивалентном объёме. Доза препарата для 3-й группы составляла 2,5 мг/кг, для 4-й —

1,25 мг/кг. Препараты дсРНК вводили за 3 ч до заражения ВГ, через 1 и 3 сут после заражения. Животным пятой группы (положительный контроль) перорально вводили противовирусный препарат Тамифлю (Ля Рош Лтд., Швейцария) в дозе 25 мг/кг через 1 ч после заражения ВГ, далее дважды в сутки в течение 4 сут после заражения (всего 10 раз в течение 5 сут). Животные, инфицированные ВГ и не получавшие препаратов, составляли группу отрицательного контроля (группа 6).

В ходе оценки противовирусной активности препаратов регистрировали гибель животных в течение 16 сут наблюдения после заражения ВГ, рассчитывали коэффициент защиты (КЗ) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей. За максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 сут после заражения ВГ, то есть гарантированное время прекращения гибели инфицированных мышей.

Метод изучения фармакологической безопасности.

Для изучения фармакологической безопасности интраназальной лекарственной формы дсРНК животные были разделены на 3 группы — 1 опытную и 2 контрольные, по 10 особей каждого пола в группе. Мышам опытной группы однократно интраназально в оба носовых хода вводили раствор препарата интраназальной формы дсРНК (образец 1) в дозе 2,5 мг/кг в объёме 10 мкл на 20 г массы тела. Животные первой контрольной группы получали физиологический раствор, второй — буфер для приготовления интраназальной формы в тех же объёмах, что и опытная группа.

В течение первых суток и один раз в день в течение 7 сут после введения оценивали внешний вид, состояние шерстного покрова, глаз, ушей, конечностей, зубов, проводили клинический осмотр животных для оценки возможных отклонений состояния здоровья.

До введения препарата, через 5 ч, 1 сут и 7 сут измеряли массу (электронные весы SCOUT II SC 4010, OHAUS, США) и температуру тела (термометр ТПЭМ-1, Россия) мышей. Через 5 и 24 ч после введения у 10 самцов и 10 самок на каждый срок забирали кровь на гематологический и биохимический анализ. В образцах крови с помощью автоматического гематологического анализатора MicroCC-20 Plus VET (США) определяли число лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит. Расчёт лейкограммы проводили стандартным методом с использованием светового микроскопа [6]. Биохимический анализ включал определение в сыворотке крови маркерных показателей, отражающих состояние основных видов обмена и интегральных систем организма. Определение уровня показателей проводили на биохимическом анализаторе Miura 200 (I.S.E. S.r.l., Италия) с помощью коммерческих наборов (АО «Вектор-Бест», Кольцово, Новосибирская обл.).

После взятия крови и эвтаназии мышей путём мгновенной дислокации шейных позвонков проводили некропсию животных, исследование и взвешивание внутренних органов (электронные аналитические весы GX-200 (AND, Япония) с последующим вычислением их весовых индексов (масса органа в мг, деленная на массу животного в г, умноженная на 10). В ходе патоморфологического исследования оценивали макроскопическое состояние грудной, брюшной и тазовой полости с находящимися в них органами и тканями. Особое внимание было уделено месту введения препаратов — области наружного носа и носовых отверстий. Визуально оценивали такие параметры как размер, форма, цвет, наличие или отсутствие выделений.

Для гистологического исследования забирали образцы внутренних органов от 5 животных обоего пола каждой опытной и контрольной группы. Органы и ткани фиксировали, обезвоживали и пропитывали парафином по общепринятой методике. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали световой микроскопией.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку и сравнение данных, полученных при изучении

противовирусной активности препаратов, осуществляли с помощью пакета компьютерных программ анализа данных «Statistica 7.0». Для проверки статистических гипотез о виде распределения показателей применяли критерий Колмогорова–Смирнова при вероятности ошибки $p > 0,10$. СПЖ представлены в виде $M \pm Sm$, где M — среднее арифметическое значение и Sm — стандартное отклонение. Сравнение СПЖ мышей в разных группах проводили с использованием U -критерия Манна–Уитни. Различия показателей выживаемости животных оценивались с помощью критерия χ^2 с учётом поправки Йетса для малых выборок. Отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Данные исследования фармакологической безопасности обрабатывали с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., США). При статистической обработке результатов термометрии и массы тела оценку нормальности распределения проводили по критерию Шапиро–Вилка. Группы с нормальным распределением сравнивали параметрическими тестами — ANOVA и t -критерием Стьюдента. При сравнении групп с распределением, отличным от нормального, а также групп с пятью переменными (гематологические данные и весовые индексы) для оценки межгрупповых различий применяли непараметрический H -критерий Краскела–Уоллиса и U -критерий Манна–Уитни. Критический уровень статистической значимости (p) для множественных сравнений принимали равным 0,05. При обнаружении статистически значимых различий проводили апостериорные сравнения с помощью двухвыборочных критериев (Стьюдента и Манна–Уитни), при этом скорректированный критический уровень значимости (p) для трёх попарных сравнений принимали равным 0,0170 (при $p = 95\%$). Экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения противовирусной активности. Введение препарата Тамифлю в течение 5 сут после заражения летальной дозой вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) защищало от гибели 90% инфицированных мышей (табл. 1). Средняя продолжительность жизни мышей этой группы значительно превышала показатели контрольных животных (более чем на 9 дней). Эти данные подтверждают адекватность использованной вирусной модели и её чувствительность к противовирусным препаратам.

Введение интраназальной формы дсРНК и препарата сравнения Ридостин (субстанция) в дозе 2,5 мг/кг по лечебно-профилактической схеме (за 3 ч до заражения, через 1 и 3 сут после заражения) обеспечивало защиту, соответственно, 50 и 40% инфицированных мышей при 100% гибели контрольных животных (см. табл. 1). Средняя продолжительность жизни мышей этих групп статистически значимо (в 1,8–1,9 раз) превышала показатель контрольных животных.

Снижение дозы исследованных препаратов дсРНК в два раза приводило к исчезновению защитного эффекта (см. табл. 1).

Аналогичные закономерности наблюдались и на другой модели экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной пандемическим штаммом ВГ A/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09). Введение интраназальной формы дсРНК, также как суб-

Таблица 1. Противовирусная активность интраназальной формы дсРНК в экспериментах на мышках линии BALB/c, инфицированных ВГ А/Aichi/2/68 (H3N2)**Table 1. Antiviral activity of intranasal dsRNA in BALB/c mice infected with influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus**

Группа (n=10)	Препарат, доза	Число (%) погибших мышей	Коэффициент защиты (КЗ), %	СПЖ, сут (M±Sm)
1	Интраназальная форма дсРНК (образец 1), 2,5 мг/кг	5 [#] (50)	50	11,20±5,07*
2	Интраназальная форма дсРНК (образец 2), 1,25 мг/кг	9 (90)	10	7,90±3,25
3	Ридостин (субстанция), 2,5 мг/кг	6 [#] (60)	40	10,70±4,79*
4	Ридостин (субстанция), 1,25 мг/кг	9 (90)	10	7,90±3,00
5	Тамифлю, 25 мг/кг	1 [#] (10)	90	15,10±2,85*
6	Контроль	10 (100)	—	5,9±0,88

Примечание. Здесь и в табл. 2: коэффициент защиты (КЗ) определяли по формуле: КЗ = % гибели в контроле – % гибели в опыте; СПЖ рассчитывали на 16-е сутки. M — среднее; Sm — стандартное отклонение; n — число животных в группе, n=10. [#] — отличие от Контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; * — отличие от Контроля по U-критерию Манна–Уитни при $p \leq 0,05$.

Note. Here and Table 2: the protection coefficient (PC) was determined by the formula: PC = % of death in the control group — % of death in the study group; Average life expectancy (ALE) was calculated on the 16th day post infection. M — mean; Sm — standard deviation; n — number of animals in the group, n=10. [#] — difference from Control according to the criterion χ^2 , $P \leq 0.05$; * — difference from Control according to the Mann–Whitney U-criterion, $P \leq 0.05$.

Таблица 2. Противовирусная активность интраназальной формы дсРНК в экспериментах на мышках линии BALB/c, инфицированных ВГ Bishkek /01/2009 (H1N1pdm09)**Table 2. Antiviral activity of intranasal dsRNA in BALB/c mice infected with influenza Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09) virus**

Группа (n=10)	Препарат, доза	Число (%) погибших мышей	Коэффициент защиты (КЗ), %	СПЖ, сут (M±Sm)
1	Интраназальная форма дсРНК (образец 1), 2,5 мг/кг	4 (40)	40	13,30±3,80*
2	Интраназальная форма дсРНК (образец 2), 1,25 мг/кг	8 (80)	10	10,60±3,69
3	Ридостин (субстанция), 2,5 мг/кг	4 (40)	40	13,00±3,92*
4	Ридостин (субстанция), 1,25 мг/кг	8 (80)	0	9,40±3,53
5	Тамифлю, 25 мг/кг	2 [#] (20)	60	14,30±3,59*
6	Контроль	8 (80)	—	9,30±3,56

станции Ридостина, в дозе 2,5 мг/кг приводило к статистически значимому увеличению средней продолжительности жизни инфицированных мышей, при этом значения показателей в этих группах не отличались от показателя положительного контроля (препарат Тамифлю) (табл. 2). Доли выживших мышей (6 из 10) в группах 1 и 3 после введения препаратов интраназальной формы дсРНК и Ридостина были равны 60% и достоверно не отличались от данного показателя в группе сравнения (8 из 10) при введении Тамифлю (80%).

Иными словами, интраназальная форма дсРНК в дозе 2,5 мг/кг обладала противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) и А/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09), что проявлялось в увеличении числа выживших мышей и средней продолжительности жизни животных. Показатели противовирусного эффекта препарата значимо не отличались от соответствующих показателей у мышей из групп сравнения (субстанция Ридостина, препарат Тамифлю).

Учитывая широкий спектр биологического действия препаратов дсРНК, помимо изучения его эффективности, необходимо было оценить наличие/отсутствие сколько-либо значимого воздействия на ключевые физиологические системы. Для изучения фармакологической безопасности препарата было проведено исследование его влияния на функцию интегральных физиологических

систем, интенсивность основных видов обмена, структуру и функцию внутренних органов.

Результаты изучения фармакологической безопасности. Результаты физиологических и гематологических исследований. Однократное введение интраназальной формы дсРНК (2,5 мг/кг) не приводило к гибели животных, изменению их внешнего вида и поведения. Показатели массы тела, динамики её прироста и температуры тела мышей опытной группы не отличалась от показателей контрольных групп ни в один из сроков наблюдения (данные не приведены).

Однократное интраназальное введение препарата дсРНК самцам и самкам мышей не оказывало существенного влияния на гематологические показатели крови. Единственным исключением, зарегистрированным в опытной группе самцов, являлось повышение, по сравнению с контрольной группой (физиологический раствор), значений гематокрита (на 28%, 7-е сутки).

Результаты биохимических исследований. В ходе биохимического исследования был определен уровень маркерных показателей крови, отражающих интенсивность основных видов обмена веществ. Интенсивность белкового обмена оценивали по содержанию в сыворотке крови общего белка, альбумина и мочевины, углеводный обмен — по содержанию глюкозы, липидный — по уровню холестерина и триглицеридов. Функ-

Таблица 3. Биохимические показатели крови самок белых аутбредных мышей ICR после однократного введения интраназальной формы дсРНК (2,5 мг/кг)

Table 3. Blood biochemical parameters of female white outbred ICR mice post single administration of intranasal dsRNA (2.5 mg/kg)

Наименование показателя	Группы животных, получавших препараты (n=10)					
	Физиологический раствор	Буфер интраназальной формы	Интраназальная форма дсРНК, 2,5 мг/кг	Физиологический раствор	Буфер интраназальной формы	Интраназальная форма дсРНК, 2,5 мг/кг
	Через 5 ч после введения	Через 5 ч после введения	Через 5 ч после введения	Через 1 сут после введения	Через 1 сут после введения	Через 1 сут после введения
Общий белок, г/л	52,4±1,3	50,8±1,1	51,6±0,7	50,9±1,2	53,4±1,0	53,3±0,9
Альбумин, г/л	29,8±1,4	31,1±0,5	32,3±0,4	31,7±0,7	32,2±0,4	32,6±0,5
Мочевина, ммоль/л	5,69±0,33	3,70±0,59	5,28±0,39	6,08±0,33	6,46±0,21	6,53±0,34
Глюкоза, ммоль/л	8,28±0,48	9,13±0,42	8,93±0,19	7,82±0,28	8,18±0,24	7,88±0,44
Общий холестерин, ммоль/л	2,94±0,08	3,06±0,16	3,05±0,17	2,90±0,06	3,00±0,32	3,15±0,16
Триглицериды, ммоль/л	3,05±0,34	2,66±0,33	3,18±0,15	2,73±0,15	2,78±0,28	2,48±0,13
Общий билирубин, мкмоль/л	1,08±0,14	1,54±0,24	1,42±0,12	2,20±0,45	2,04±0,11	2,18±0,04
Аланинаминотрансфераза, Е/л	39,1±2,7	41,0±2,7	48,2±4,7	27,5±2,1	28,6±2,2	26,9±2,0
Аспартатаминотрансфераза, Е/л	139,7±9,9	152,1±9,1	146,7±12,0	114,3±8,0	153,0±8,5	142,8±8,1
Щелочная фосфатаза, Е/л	743±85	779±20	737±40	660±47	622±43	637±49
Калий, ммоль/л	7,24±0,14	6,92±0,35	7,41±0,25	6,85±0,33	7,66±0,37	8,01±0,27
Кальций, ммоль/л	2,32±0,05	2,37±0,02	2,41±0,02	2,41±0,03	2,40±0,05	2,43±0,03
Хлориды, ммоль/л	113,1±1,2	115,2±1,5	114,0±1,1	109,8±0,3	113,0±0,5	114,7±0,6
					*p=0,0122	*p=0,0122
Магний, ммоль/л	1,38±0,04	1,34±0,05	1,38±0,03	1,30±0,03	1,33±0,02	1,36±0,04
Фосфор, ммоль/л	3,38±0,07	3,30±0,06	3,47±0,13	3,24±0,15	3,28±0,15	3,57±0,15

Примечание. Здесь и в табл. 4: * — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили физиологический раствор, $p < 0,0170$; n — число животных в группе.

Note. Here and Table 4: * — statistically significant difference compared to the group of mice administered with saline solution, $P < 0.0170$; n — number of animals in the group.

ционирование пищеварительной системы оценивали по показателям, отражающим структуру и функцию печени, желчевыводящих путей (общий белок, альбумин, общий билирубин, аланинаминотрансфераза (АлТ), аспартатаминотрансфераза (АсТ), щелочная фосфатаза) и поджелудочной железы (глюкоза, триглицериды). Для выявления возможных нарушений работы сердечно-сосудистой системы проведено определение таких показателей, как аспартатаминотрансфераза (АсТ), общий холестерин и триглицериды. Показатели содержания в крови белка, мочевины и электролитов (калий, кальций, хлориды) были использованы для характеристики функции выделительной системы, в частности, почек. Анализ содержания в крови ионов магния и фосфора позволил оценить баланс электролитов, свидетельствующий о функции костно-мышечной, нервной и выделительной систем организма.

Исследование показало, что однократное введение дсРНК в интраназальной форме не оказывало значимого влияния на метаболизм белков, углеводов и липидов опытных мышей (табл. 3).

Не обнаружено существенных различий и в показателях крови, отражающих функционирование пищеварительной и сердечно-сосудистой систем опытных и контрольных животных.

Анализ состояния выделительной системы, в целом, не обнаружил влияния препаратов на функцию почек. Единственным выявленным от-

личием было незначительное по величине превышение концентрации хлоридов после введения интраназальной формы дсРНК (на 4,5%) к концу первых суток относительно показателя животных, получавших физиологический раствор. При этом надо отметить, что аналогичное изменение, не выходящее за пределы диапазона физиологической нормы, наблюдалось и в контрольной группе мышей после введения буфера разведения, что свидетельствует о его неспецифическом характере. Изменения других электролитов — калия, кальция, магния и фосфора, в крови опытных животных не обнаружено.

Патоморфологическое исследование показало, что однократное введение интраназальной формы дсРНК не оказывало влияния на размер, форму и цвет области введения — наружного носа и носовых отверстий. У мышей всех экспериментальных групп перечисленные органы и ткани без признаков отёчности и покраснения. Изменений в количестве и характере выделений из носа у животных опытной и контрольных групп не отмечено. Влияния препарата на весовые индексы внутренних органов самок мышей через 1 и 7 сут не наблюдалось (данные не показаны). Единственным изменением в группе самок мышей было незначительное снижение (на 9%) весовых индексов правой и левой почек на 7-е сутки по сравнению с показателями животных контрольной группы (физиологический раствор).

Таблица 4. Относительная масса внутренних органов самцов белых аутбредных мышей ICR после однократного введения интраназальной формы дсРНК (2,5 мг/кг)

Table 4. Relative weight of internal organs of male white outbred ICR mice post single administration of intranasal dsRNA (2.5 mg/kg)

Группы животных, получавших препараты (n=10)	Масса животного, г	Весовые индексы органов, ×10, мг/г						
		сердце	легкое	печень	почки		селезёнка	тимус
					левая	правая		
Через 1 сутки после введения								
Физиологический раствор	21,7±0,2	48,9±1,4	75,4±2,7	581±11,5	63,6±2,3	67,3±3,1	64,6±5,1	45,3±1,7
Буфер интраназальной формы	21,6±0,6	48,0±2,4	80,4±4,8	569±7,9	64,4±1,1	66,9±0,9	51,9±1,5	52,1±3,2
Интраназальная форма дсРНК	21,9±0,4	48,0±1,6	75,4±3,1	544±8,0	64,1±1,3	66,7±1,7	62,1±2,0	50,6±2,1
Через 7 суток после введения								
Физиологический раствор	26,9±0,8	54,3±1,2	77,9±3,9	635±16,2	70,1±0,7	71,5±1,3	64,3±3,9	43,7±1,9
Буфер интраназальной формы	27,2±0,6	57,1±4,8	78,1±1,7	645±29,2	71,6±2,4	72,2±2,1	49,3±4,6	43,4±2,8
Интраназальная форма дсРНК	27,1±0,8	58,9±2,1	78,6±1,8	615±12,8	63,8±0,5	65,3±0,7	49,2±2,1	46,4±1,7
					*p=0,012		*p=0,012	

(табл. 4). В ходе гистологического изучения не выявлено влияния препарата на микроструктуру органов и тканей мышей через 5 ч, 1 и 7 сут после однократного интраназального введения.

Таким образом, интраназальная форма дсРНК в дозе 2,5 мг/кг не приводила к гибели мышей или появлению внешних признаков интоксикации, не вызывала изменения массы и температуры тела, уровня гематологических показателей. Препарат дсРНК не оказывал влияния на маркерные биохимические показатели крови, макро- и микроскопическую картину внутренних органов, на основании чего сделан вывод об отсутствии у препарата токсического воздействия на основные физиологические системы организма (сердечно-сосудистую, пищеварительную, выделительную) и интенсивность основных видов обмена (белковый, углеводный, липидный).

Заключение

На модели гриппозной инфекции показано, что интраназальная форма препарата дсРНК при лечебно-профилактической схеме применения повышает выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, инфицированных летальными дозами вируса сезонного гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и вируса гриппа с пандемическим потенциалом A/Bishkek/01/2009 (H1N1pdm09). Защитный эффект препарата на модели инфекции, вызванной вирусом A/Bishkek/01/2009, был сравним с эффектом препарата Тамифлю. Отсутствие токсического воздействия интраназальной формы дсРНК в фармакологической дозе на организм лабораторных мышей, состояние физиологических систем организма и основные виды обмена позволяет сделать вывод о фармакологической безопасности препарата.

Литература/References

1. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двуспиральных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии. Биомедицинская химия. 2019; 65 (4): 277–293. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. [Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G. M. Development of drugs on the basis of high-polymeric double-stranded RNA

Полученные данные подтверждают перспективность и обоснованность продолжения работ по завершению разработки новой лекарственной формы дсРНК для интраназального применения в качестве средства профилактики и лечения гриппа и других острых респираторных вирусных заболеваний.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование проведено в рамках работ по выполнению государственного задания ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, тема ГЗ-38/21.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Участие авторов. Гамалей С. Г. — интерпретация результатов фармакологической безопасности, написание статьи; Шиминова Г. Г. — оценка влияния препарата на физиологические и гематологические показатели мышей; Цыпенкова Е. С. — проведение эксперимента по оценке фармакологической безопасности; Скарнович М. О., Скарнович М. А. — оценка противовирусных свойств препаратов; Шишкина Л. Н. — анализ и интерпретация данных противовирусной активности препаратов; Таранов О. С. — гистологическая оценка влияния препарата на органы и ткани мышей; Симакова О. В. — оценка влияния препарата на биохимические показатели крови мышей; Иванова О. С. — получение и характеристика интраназальной формы препарата дсРНК; Левагина Г. М. — выбор рецептуры интраназальной формы препарата дсРНК; Даниленко Е. Д. — постановка задачи, окончательное редактирование статьи.

- for antiviral and antitumor therapy. Biomeditsinskaya Khimiya. 2019; 65 (4): 277–293. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. (in Russian)]
2. Иванова О.С., Левагина Г.М., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н., Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д. Получение и характеристика препарата двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для интраназального применения. Биофармацевтический журнал. 2019; 11 (4): 29–33. [Ivanova O.S., Levagina G.M., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A., Shishkina L.N., Gamaley S.G., Danilenko E.D. Obtaining

and characterization of double stranded RNA preparation from *Saccharomyces cerevisiae* yeast for intranasal application. Biofarmatsevticheski Zhurnal. 2019; 11 (4): 29–33. (in Russian)]

3. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. / Под ред. Белозерцевой И.В., Блинова Д.В., Красильниковой М.С. Восьмое издание. пер. с англ. — М.: ИРБИС; 2017. [Guide for the care and use of laboratory animals. 8th. ed. Belozereva I.V., Blinov D.V., Krasil'shnikova M.S., eds. Moscow: Irbis; 2017. (in Russian)]
4. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Пер. с англ. RusLasa. — С-ПБ; 2012. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Translated by RusLasa. — S-PB; 2012.] Доступно по: [https://ruslasa.ru/wp-content/up-](https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf)

- loads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf. Ссылка активна на 20.07.2022. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур; ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. [ГОСТ 33215-2014 Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila oborudovaniya pomeshchenii i organizatsii protsedur; ГОСТ 33216-2014 Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila soderzhaniya i ukhoda za laboratornymi gryzunami i krolnikami. (in Russian)]
6. Новицкий В.В., Евтушенко О.М. Руководство к практическим занятиям по гематологии. Томск; 1999. [Novitskiy V.V., Evtushenko O.M. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po gematologii. Tomsk; 1999. (in Russian)]

Информация об авторах

Гамалей Светлана Георгиевна — зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Шими́на Галина Георгиевна — научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-1078-7033.

Цыпленкова Елена Сергеевна — младший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-1277-6258

Симакова Ольга Владимировна — младший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-1222-7574

Скарнович Максим Олегович — старший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Скарнович Мария Александровна — научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 6381-5817. Scopus Author ID: 57189059427

Шишкина Лариса Николаевна — д. б. н., зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Таранов Олег Святославович — зав. отделом микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-6746-8092. ResearcherID: A-5657-2014. eLIBRARY SPIN-код: 5894-6518. Scopus Author ID: 8938697800

Иванова Ольга Сергеевна — к. б. н., научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310

Левагина Галина Михайловна — к. б. н., зав. отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Даниленко Елена Дмитриевна — к. б. н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия. ORCID-ID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682

About the authors

Svetlana G. Gamaley — Head of the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Galina G. Shimina — Researcher at the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-1078-7033

Elena S. Tsyplenkova — Junior researcher at the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-1277-6258

Olga V. Simakova — Junior researcher at the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-1222-7574

Maxim O. Skarnovich — M. D., Senior researcher at the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Maria A. Skarnovich — Researcher at the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 6381-5817. Scopus Author ID: 57189059427

Larisa N. Shishkina — D. Sc. in Biology, Head of the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Oleg S. Taranov — Head of the Department of Microscopy, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzorg, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-6746-8092. ResearcherID: A-5657-2014. eLIBRARY SPIN-код: 5894-6518. Scopus Author ID: 8938697800

Olga S. Ivanova — Ph. D. in Biology, Researcher at the Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310

Galina M. Levagina — Ph. D. in Biology, Head of the Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Elena D. Danilenko — Ph. D. in Biology, Director of the Institute of Medical Biotechnology, SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. ORCID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682

Противовирусная активность препарата Мефлохин® в отношении COVID-19

С. Я. ЛОГИНОВА¹, В. Н. ЩУКИНА¹, С. В. САВЕНКО¹, *С. В. БОРИСЕВИЧ¹,
К. Н. ФИЛИН², И. А. БЕРЗИН³, В. Д. ГЛАДКИХ³

¹ ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад

² Федеральное государственное унитарное предприятие Научно-производственный центр «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства, Московская обл., Химки, Россия

³ Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, Россия

Antiviral Activity of The Preparation Meflokhin® Against COVID-19

SVETLANA YA. LOGINOVA¹, VERONIKA N. SHHUKINA¹, SERGEJ V. SAVENKO¹,
*SERGEJ V. BORISEVICH¹, KONSTANTIN N. FILIN²,
IGOR A. BERZIN³, VADIM D. GLADKIKH³

¹ 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, *Sergiev Posad, Russia*

² Federal State Unitary Enterprise Research & Production Center «Farmzashita» of the Federal Medical-Biological Agency, *Khimki, Russia*

³ Federal Medical-Biological Agency, *Moscow, Russia*

Резюме

Вирусное заболевание COVID-19 вызвало чрезвычайную ситуацию мирового масштаба и привлекло к себе внимание специалистов здравоохранения и населения во всём мире. Значительный рост числа новых случаев инфицирования этим вирусом демонстрирует актуальность поиска лекарственных препаратов, эффективных в отношении данного возбудителя. Целью настоящей работы явилась оценка противовирусной эффективности препарата Мефлохин® в отношении COVID-19. Изучена противовирусная эффективность препарата Мефлохин® в отношении нового пандемического вируса SARS-CoV-2 в экспериментах *in vitro* в культуре клеток Vero C1008 и *in vivo* на сирийских золотистых хомяках. Результаты исследования выявили, что препарат Мефлохин® в концентрации 2,0 мкг/мл при внесении его после инфицирования клеток подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 на 1,7–1,9 lg, коэффициент ингибирования — около 99%. При применении Мефлохина патологические изменения в ткани лёгких были менее выражены, чем в контрольной группе. Через 6 сут после инфицирования показано, что при применении Мефлохина отмечается статистически значимое снижение вирусной нагрузки в лёгких инфицированных сирийских золотистых хомяков с коэффициентом ингибирования 95,5%.

Ключевые слова: Мефлохин®; Рибавирин; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; противовирусная активность

Для цитирования: Логинова С. Я., Щукина В. Н., Савенко С. В., Борисевич С. В., Филин К. Н., Берзин И. А., Гладких В. Д. Противовирусная активность препарата Мефлохин® в отношении COVID-19. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 49–54. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-49-54>.

Abstract

The COVID-19 virus has caused a global emergency and has attracted the attention of healthcare professionals and the public around the world. The significant increase in the number of new cases of infection with this virus demonstrates the relevance of the search for drugs that are effective against this pathogen. The aim of this work was to evaluate the antiviral efficacy of Mefloquin® against COVID-19. The antiviral efficacy of Mefloquin® against the new pandemic virus SARS-CoV-2 was studied in *in vitro* experiments in Vero C1008 cell culture and *in vivo* on Syrian golden hamsters. The results of the study revealed that the drug Mefloquine® at a concentration of 2.0 µg ml⁻¹, when applied after infection of cells, suppresses the reproduction of the SARS-CoV-2 virus by 1.7–1.9 lg, the inhibition rate is about 99%. When using Mefloquine, pathological changes in the lung tissue were less pronounced than in the control group. 6 days after infection, it was shown that when using Mefloquine, there was a statistically significant decrease in viral load in the lungs of infected Syrian golden hamsters, with an inhibition rate of 95.5%.

Keywords: Mefloquine®; Ribavirin; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; antiviral activity.

For citation: Loginova S. Ya., Shhukina V. N., Borisevich S. V., Filin K. N., Berzin I. A., Gladkikh V. D. Antiviral activity of the preparation Meflokhin® against COVID-19. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 9–10: 49–54. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-49-54>.

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная вирусом тяжёлого острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2), возникла в Ухане (Китай) и унесла миллионы жизней по всему миру. Соединённые Штаты Америки, Индия, Бразилия, Франция, Испания, Аргентина, Великобритания, Италия, Испания, Германия и др. в настоящее время являются ведущими странами с наибольшим количеством подтверждённых случаев заболевания и связанных с ними смертей. Динамика этой пандемии вызывает озабоченность по поводу безопасности населения мира и требует ответственных действий всего общества. Семейство коронавирусов открыто в 1965 г. и до конца 2002 г. считались обычными возбудителями сезонных ОРВИ [1]. Однако в 2002 г. коронавирус SARS-CoV уже вызывал вспышку инфекций, приводящую к серьёзному заболеванию в виде тяжёлого острого респираторного синдрома — «атипичной пневмонии» с уровнем смертности 10% (8000 выявленных случаев и 800 смертей) [2–5]. В 2012 г. мир столкнулся с новым коронавирусом MERS с уровнем смертности 35% (всего диагностировано 2250 выявленных случаев и около 850 смертей) [6]. Следует отметить, что COVID-19 отличается стремительным распространением, несмотря на принятые меры [7, 8].

Безусловно для решения проблемы коронавирусной пандемии важным является разработка эффективных вакцин. Но в настоящее время существует значительная прослойка населения (около 25%) со сформированным иммунодефицитом, аллергией, вакцинация которых недопустима. Кроме того, несмотря на важность разработки вакцин и биологических терапевтических средств для предотвращения распространения SARS-CoV-2, перед применением вакцины среди населения требуется тщательная оценка возможных иммунных осложнений. Мутации гена вируса и эффект антителозависимого усиления (ADE) могут повлиять на эффективность разработанных биологических вакцин или даже спровоцировать контрпродуктивный иммунный ответ.

В связи с этим актуальным является перепрофилирование имеющихся и разработка новых противовирусных лекарственных препаратов. Поскольку разработка новых лекарств — длительный и дорогостоящий процесс, в связи с неотложностью пандемии, усилия были направлены на выявление возможных вариантов лечения среди имеющихся на рынке лекарств или одобренных. Перепрофилирование лекарств, также известное как репозиционирование лекарств, является одним из лучших решений для поиска терапевтических решений для COVID-19 в критическом по времени режиме. В связи с этим обстоятельством использовали разные противовирусные препараты и их комбинации, применяющиеся для

лечения и профилактики разных штаммов ОРВИ и других вирусных инфекций.

Цель работы — оценка противовирусной эффективности препарата Мефлохин *in vitro* и *in vivo* в отношении SARS-CoV-2 (COVID-19), представленный Научно-производственным центром «Фармзащита».

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус SARS-CoV-2, вариант В, полученный в 2020 г. из ФГБУ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и хранившийся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Культура клеток и среды. Эксперименты проводили на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки — Vero C1008. В качестве ростовой и поддерживающей применяли среду Игла (MEM) на солевом растворе Хенкса, содержащую соответственно 7,5 и 2% фетальной телячьей сыворотки.

Исследуемый препарат. Мефлохин® — препарат представлен научно-производственным центром «Фармзащита».

Расчёт доз для лабораторных животных проводили по показателям поверхности тела/массе, исходя из терапевтических доз для человека [9, 10].

Референс-препарат. Рибавирин® — химиопрепарат (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) производства Dragon Hwa ChemPharm Co. Limited, серия 20031110. Капсулу с препаратом (100 мг) растворяли в 10 мл стерильного БФР с антибиотиками, 100 мкл внутримышечно.

Ребиф® — интерферон бета-1α, серия RBS403004C, Merck Serono S.p.A., Швейцария.

Лабораторные животные. В работе были использованы сирийские золотистые хомяки (массой 50–70 г). Акклиматизация животных проходила в течение 3 дней.

Содержание и обслуживание животных осуществляли в соответствии с СП №1045 73 по содержанию, обустройству вивариев (ГОСТ Р 53434-2009) и Руководству по лабораторным животным (2010 г.); Правилами по защите животных.

Кормление грызунов осуществлялось полноценным гранулированным комбикормом, исключающем необходимость введения дополнительных ингредиентов — «Комбикорм для содержания крыс, мышей, хомяков», ГОСТ — Р 50258-92 ПК-121-10 ООО «Лабораторкорм» (Москва) и «Полноценный комбикорм для лабораторных животных (для разведения крыс, мышей, хомяков), ПК-120-1 847 ООО «Лабораторкорм» (Москва). Перед вскармливанием корм стерилизуют автоклавированием 121°C, 1,2 АТ, 20 мин.

Лабораторных животных размещали в ведра пластмассовые прямого контакта с подстилкой. В качестве подстилки использовали опилки из экологичной древесины и подстил для лабораторных животных REHOFIX®, Германия. Подстилка автоклавировалась при 118°C в течение 30 мин. Чистку клеток осуществляли каждый день. Поилки с водой меняли ежедневно. Температуру и влажность воздуха поддерживали, соответственно, 15–21°C и 30–70%, свет/темнота режим 12 ч. Вход в комнату ограничен при соблюдении условий биобезопасности 2-го уровня (смена одежды, перчатки, сменная обувь, респиратор).

Животных инфицировали перорально в дозе 3×10^5 БОЕ. Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 6 сут, при этом контролировали уровень накопления возбудителя в лёгких в начальном периоде инфекции (1-е сутки), на пике инфекции (2,4 сут) и на 6-е сутки после заражения. Выделение вируса проводили в культуре клеток Vero, C1008 по формированию негативных колоний (БОЕ).

Критерии оценки тяжести течения инфекции у лабораторных животных. Обнаружение вируса в лёгких, патологоанатомические изменения в лёгких инфицированных животных, поведение, внешний вид.

Оценка биологических свойств возбудителя SARS-CoV-2.

Биологическую активность оценивали титрованием вирус-содержащей суспензии в культуре клеток Vero Cl008 по цитопатическому действию вируса и формированию негативных колоний.

Расчёт биологической активности (А) культуры штамма вируса в БОЕ/мл, проводили по формуле:

$$A = \frac{\bar{a} \times b_n}{c}, \quad (1)$$

где: $\bar{a}$ — среднее взвешенное число бляшек на флакон; b_n — степень наивысшего разведения; c — объём инокулята, мл.

$$\bar{a} = \frac{\bar{a}_1 + \bar{a}_2 + \dots + \bar{a}_n}{b_n \left(\frac{1}{b_1} + \frac{1}{b_2} + \dots + \frac{1}{b_n} \right)}, \quad (2)$$

где: $\bar{a}_1 \dots \bar{a}_n$ — среднее число бляшек в 1 по n разведение исследуемого материала; $b_1 \dots b_n$ — степень разведения исследуемого материала.

Оценка противовирусной эффективности экспериментальных субстанций осуществлена в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России [10].

Коэффициент ингибирования (Ки, %) рассчитывается по формуле:

$$Ki = \frac{A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}}{A_{\text{контр}}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где: $A_{\text{контр}}$ — биологическая активность вируса, определённая в клетках без внесения химиопрепарата, БОЕ/мл⁻¹; $A_{\text{оп}}$ — биологическая активность вируса, определённая в клетках с внесением химиопрепарата, БОЕ/мл⁻¹.

Критерии оценки эффективности препарата *in vivo*: снижение уровня вирусной нагрузки в органе-мишени (лёгком) не менее чем на 1,25–2,00 lg на пике развития инфекции [10]; купирование патологоанатомических изменений в лёгких инфицированных животных; отсутствие внешних признаков заболевания в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России [10]. Все опыты на животных были проведены в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации — ГОСТ Р 53434-2009 «принципы надлежащей лабораторной практики».

Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vitro* являются снижение уровня накопления вируса (Δ , lg), коэффициент ингибирования репродукции вируса (КИ, %).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Полученные результаты представлены в виде среднего $\pm$ ошибка репрезентативности ($\bar{x} \pm \sigma_x$) [11, 12].

Результаты и обсуждение

Метод оценки эффективности лекарственных препаратов по подавлению репродукции вируса позволяет точно оценивать противовирусную активность препаратов в опытах *in vitro*. Принцип метода основан на способности вирусов размножаться в культуре клеток, а также способности эффективных НМСЗ подавлять их репродукцию.

Как правило, первым этапом скрининга химических соединений (кандидатов в фармацевтические средства) является изучение их токсичности. В процессе исследования токсичности соединения изучается влияние различных концентраций препарата на морфологию клеток. Наиболее простым и доступным методом оценки цитотоксичности является визуальное наблюдение за состоянием клеток с помощью светового микроскопа при малом увеличении. Изучение цитотоксичности препарата показало, что максимальная стартовая концентрация препарата Мефлохин для оценки противовирусной активности *in vitro* составила 2,00–2,25 мкг/мл.

Изучение противовирусной активности препарата Мефлохин проводили в культуре клеток Vero Cl008, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант В, по показателю ингибирования цитопатической активности вируса. Схемы внесения препарата: за 24 ч, за 1 ч до инфицирования клеток и через 1 ч после. Культуру клеток инфицировали вирусом SARS-CoV-2, вариант В, в дозе 10 ЦПД₅₀.

Через 48 ч после инфицирования клеток цитопатический эффект отсутствовал при внесении препарата Мефлохин после заражения клеток в концентрации 2,0 мкг/мл. В контрольной группе цитопатический эффект составил 100% (12/12). При внесении препарата за 1 ч до инфицирования подавление цитопатической активности вируса не выявлено во всех изученных концентрациях. При внесении препарата за 24 ч до инфицирования 50% подавление ЦПД отмечено в концентрации 1 мкг/мл (табл. 1).

Таблица 1. Оценка противовирусной активности препарата Мефлохин в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero Cl008, через 48 ч после инфицирования (доза инфицирования 10 ЦПД) ($n=3$)

Table 1. Evaluation of the antiviral activity of Mefloquine against the SARS-CoV-2 virus, variant B, in Vero Cl008 cell culture, 48 hours after infection (infection dose 10 CPP) ($n=3$)

Схема применения препарата	Концентрация препарата, мкг/мл	Частота выявления ЦПД	Коэффициент ингибирования ЦПД, %
За 24 ч до инфицирования	2	12/12	0
	1	6/12	50
	0,5	9/12	25
За 1 ч до инфицирования	2	12/12	0
	1	12/12	0
	0,5	12/12	0
Через 1 ч после инфицирования	2	0/12	100
	1	12/12	0
	0,5	12/12	0
Контроль инфицирующей дозы	—	12/12	—
Контроль среды	—	0/12	—

Таблица 2. Оценка противовирусной активности препарата Мефлохин в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008, через 48 ч после инфицирования
Table 2. Evaluation of the antiviral activity of Mefloquine against the SARS-CoV-2 virus, variant B, in Vero C1008 cell culture, 48 hours after infection

Препарат	Концентрация препарата, мкг	Уровень накопления вируса, lg БОЕ/мл	Снижение уровня накопления вируса, Δ , lg	Коэффициент ингибирования, КИ, %
Мефлохин	2,0	4,50±0,09	1,94	99,06
Ребиф® Rebit®	10 ³	0,00±0,00	6,44	100
Интерферон β 1 α	10 ²	0,00±0,00	6,44	100
Рибавирин	100	4,23±0,03	2,21	99,38
Контроль дозы инфицирования	—	6,44±0,09	—	—

Таблица 3. Результаты наблюдения изменения в лёгких при вскрытии леченных сирийских золотистых хомячков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2
Table 3. Observation results of lung changes at necropsy of treated Syrian golden hamsters infected with SARS-CoV-2 virus

Группа животных	Поражение лёгких, срок наблюдения, сут			
	1-е	2-е	4-е	6-е
Мефлохин	0,3±0,3	0,0±0,0	1,0±0,0	1,3±0,3
Рибавирин	0,5±0,5	0,5±0,5	0,7±0,3	1,7±0,3
Контроль инфицированных животных	0,0±0,0	0,7±0,3	2,0±0,0	2,0±0,0
— (0 баллов)	Лёгкие имеют нормальное анатомо-физиологическое состояние. Цвет лёгких бледно-розовый, сосудистый рисунок не выражен. Лёгкие по объёму и консистенции в норме, края органа ровные.			
+	Лёгкие наполнены, в бронхиальной части кровеносные сосуды расширены. Края верхних долей ровные, серо-розового цвета. Нижние доли лёгкого бледно-розового цвета, видимых повреждений нет.			
(1 балл)				
++ (2 балла)	Лёгкие наполнены, отечные, локальные поражения, цвет неровный «мраморный». Видимые изменения наблюдаются во всех долях.			
+++ (3 балла)	Цвет патологических участков лёгких — насыщенный красный, иногда с грязно серым оттенком. Характер поражений лёгких — рубцовая ткань. Сосудистый рисунок лёгких, особенно у корня, увеличен.			

Через 24 ч после инфицирования клеток цитопатический эффект отсутствовал при внесении препарата Мефлохин как до инфицирования, так и после заражения клеток в диапазоне концентраций 0,5–2,0 мкг/мл. В контрольной группе цитопатический эффект составил 75% (9/12).

Было оценено влияние препарата Мефлохин на репродукцию вируса SARS-CoV-2, вариант В, в культуре клеток Vero C1008, при внесении препарата после инфицирования через 48 ч инкубирования (табл. 2).

Препарат Мефлохин в концентрации 2,0 мкг/мл при внесении его после инфицирования клеток подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 на 1,9 lg, коэффициент ингибирования — около 99%.

Референс-препараты выявили высокую противовирусную эффективность. Интерферон Ребиф® полностью подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero C1008 в концентрации 100 МЕ/мл. Противовирусная активность Рибавирина в концентрации 100 мкг/мл составила 99,38%.

Изучение терапевтической эффективности препарата Мефлохин проводили на сирийских золотистых хомяках, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант В, в дозе 5×10^5 БОЕ в 200 мкл.

В эксперименте была использована схема применения препарата: после инфицирования 1- и 2-е

сутки в дозе 8,8 мг/кг (соответствующей 500 мг для человека), 3–6-е сутки в дозе 3,5 мг/кг (соответствующей 200 мг для человека). Проведён сравнительный анализ влияния вируса SARS-CoV-2 на изменения в лёгких при пероральном инфицировании леченных животных по сравнению с инфицированными нелечеными хомяками. Результаты наблюдений представлены в табл. 3.

По данным литературы и собственным исследованиям составлена таблица рейтинговой оценки поражения лёгких хомячков (см. табл. 3), инфицированных вирусом SARS-CoV-2, которая позволяет проводить не только качественную оценку поражения лёгких, но и количественную. Из данных рейтинговой оценки поражения лёгких сирийских золотистых хомячков видно, что наиболее тяжёлые формы поражения зарегистрированы на 4-, 6-е сутки после инфицирования у контрольных нелеченых животных.

При патологоанатомическом вскрытии хомяков через сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2 у контрольной группы патологические изменения в лёгких не выявлены. В течение первых суток наблюдения в группе леченых животных как Мефлохином, так и референс-препаратом отмечены незначительные изменения в ткани лёгких. При применении Мефлохина у 1/3 животных — слабовыраженная распростра-

Таблица 4. Результаты оценки уровня инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в легких сирийских хомяков
Table 4. The results of assessing the infectious titer level of the SARS-CoV-2 virus in the lungs of Syrian hamsters

Препарат	Параметры	Время после инфицирования, сут			
		1	2	4	6
Мефлохин	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ×г ⁻¹ , $\bar{x} \pm \sigma_x$	6,76±0,07	5,76±0,07	6,23±0,04	2,16±0,13
	Снижение уровня накопления, Δ, lg	Отсутствует	0,28	0,03	1,34
	Коэффициент ингибирования, %	Отсутствует	47,54	7,39	95,47
Рибавирин, в/м 20 мг/кг	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ×г ⁻¹ , $\bar{x} \pm \sigma_x$	6,22±0,04	4,96±0,06	6,40±0,03	5,15±0,05
	Снижение уровня накопления, Δ, lg	Отсутствует	0,08	Отсутствует	Отсутствует
	Коэффициент ингибирования, %	Отсутствует	17,05	Отсутствует	Отсутствует
Контроль	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ×г ⁻¹ , $\bar{x} \pm \sigma_x$	6,00±0,21	6,04±0,38	6,27±0,04	3,50±0,21

нённая (диффузная) катаральная пневмония и у 2/3 — поражение лёгких не выявлено.

Через 48 ч у всех сирийских хомяков, принимавших Мефлохин, поражения лёгких не выявлено. В контрольной группе — у 1/3 животных — слабовыраженная распространённая (диффузная) катаральная пневмония и у 2/3 — поражение лёгких не выявлено.

Через 4 сут наиболее выраженные, визуально наблюдаемые, изменения ткани лёгких были отмечены в группе контрольных животных: отёчные, локальное поражение гранатового цвета, цвет неровный, «мраморный», тёмно-красный. Статистически менее выраженные (с вероятностью 95%) поражения лёгких были выявлены у животных, принимавших лекарственные препараты. В лёгких животных, леченых Мефлохином, выявлена слабовыраженная распространённая (диффузная) катаральная пневмония.

На 6-е сутки после заражения ярко выраженные изменения ткани лёгких были отмечены в группе контрольных животных. В опытной группе патологические изменения в ткани лёгких были менее выражены, чем в контрольной группе. У 100% обследованных животных, леченых Мефлохином, выявлена слабовыраженная распространённая (диффузная) катаральная пневмония. В контрольной группе — у 100% инфицированных сирийских золотистых хомяков множественные катаральные очаги, цвет патологических участков лёгких — насыщенный красный.

В группе плацебо у сирийских хомяков лёгкие имели нормальное анатомо-физиологическое состояние, бледно-розовый цвет, с невыраженным сосудистым рисунком. Лёгкие по объёму и консистенции были в норме, края ровные.

Таким образом, в результате проведённых патологоанатомических исследований было выявлено, что наиболее тяжёлые формы поражения лёгких регистрируются у сирийских золотистых хомяков, не принимавших лекарственные препараты, при заражении вирусом SARS-CoV-2 в дозе 5,7 lg БОЕ на особь на 4–6 сут. Патологоанатомическая картина поражения лёгких у животных

преимущественно характеризовалась развитием пневмонии.

Оценивали концентрацию вируса в лёгких на 1-, 2-, 4- и 6-е сутки после инфицирования. Результаты оценки уровня инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в ткани лёгких представлены в табл. 4.

Через 48 ч отмечено незначительное снижение вирусной нагрузки в лёгких сирийских золотистых хомяков, принимавших перорально Мефлохин, коэффициент ингибирования составил 47,5%. Через 96 ч после инфицирования снижение вирусной нагрузки в органе-мишени составило 7,4%.

Через 6 сут после инфицирования выявлено снижение накопления вируса в лёгких контрольной группы, отмечено начало элиминации возбудителя из органа-мишени. Уровень накопления вируса в лёгких составил 3,5 lg БОЕ/г. При применении Мефлохина снижение вирусной нагрузки в лёгких сирийских золотистых хомяков составило 1,34 lg, уровень накопления — 2,16 lg БОЕ/г, коэффициент ингибирования — 95,47%.

Заключение

Препарат Мефлохин обладает высокой токсичностью для культуры клеток Vero Cl008, максимальная стартовая концентрация для оценки противовирусной эффективности *in vitro* составила 2,00–2,25 мкг/мл.

Мефлохин выявил максимальную эффективность по подавлению цитопатической активности вируса SARS-CoV-2 при внесении его через 1 ч после заражения клеток в концентрации 2 мкг/мл. Коэффициент ингибирования цитопатической активности вируса составил 100%. Уровень ингибирования при оценке по репродукции вируса составил 99,4%.

Изучение терапевтической эффективности препарата Мефлохин проводили на сирийских золотистых хомяках, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант B, в дозе 5×10⁵ БОЕ, показало, что применение Мефлохина вызывает умеренное купирование размножения вируса в органе-мишени лёгком в терминальной

фазе наблюдения. Патологоанатомические исследования выявили, что наиболее тяжёлые формы поражения лёгких регистрируются у сирийских хомячков, не принимавших лекарственные препараты. Патологоанатомическая картина поражения лёгких у животных преимущественно характеризовалась развитием пневмонии.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Логинова С. Я. — концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, написание текста, сбор и обработка материала, редактирование; Щукина В. Н. — сбор и

обработка материала, статистический анализ; написание текста; Савенко С. В. — сбор и обработка материала; Борисевич С. В. — написание текста, редактирование; Филин К. Н. — сбор данных литературы; Берзин И. А. — сбор данных литературы; Гладких В. Д. — сбор данных литературы.

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contribution. Loginova S. Ja — research concept and design, literature data collection, material collection and processing, text writing, text editing; Shhukina V. N. — material collection and processing, text writing, statistic analysis; Savenko S. V. — material collection and processing; Borisevich S. V. — text writing, text editing; Filin K. N., Berzin I. A., Gladkikh V. D. — literature data collection.

Литература/References

- 1 Su S., Wong G., Shi W. *et al.* Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016; 24: 490–502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003. Epub 2016 Mar 21.
- 2 Cui J., Li F., Shi Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17: 181–192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- 3 Zhong N.S., Zheng B.J., Li Y.M. *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet.* 2003; 362: 1353–1358. doi: 10.1016/s0140-6736(03)14630-2.
- 4 Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S. *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1953–1966. doi: 10.1056/NEJMoa030781. Epub 2003 Apr 10.
- 5 Drost C., Günther S., Preiser W. *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1967–1976. doi: 10.1056/NEJMoa030747. Epub 2003 Apr 10.
- 6 Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 2012; 367: 1814–1820. doi: 10.1056/NEJMoa1211721.
- 7 Desforges M., Le Coupanec A., Dubeau P., Bourgouin A., Lajoie L., Dubé M., Talbot P.J. Human coronaviruses and other respiratory viruses: un-

- derestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? *Viruses.* 2019 Dec 20; 12 (1). 14. doi: 10.3390/v12010014.
- 8 Wong G., Liu W., Liu Y., Zhou B., Bi Y., Gao G.F. MERS, SARS, and Ebola: the role of super-spreaders in infectious disease. *Cell Host Microbe.* 2015; 18: 398–401. doi: 10.1016/j.chom.2015.09.013.
 - 9 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. Moscow: Minzdrav RF, 2005. (in Russian)]
 - 10 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2012. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Moscow: FGBU «NTSESMP»Minzdravsotsrazvitiya Rossii, 2012. (in Russian)]
 - 11 Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз, 1962; 180. [Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh. Leningrad: Medgiz., 1962; 180. (in Russian)]
 - 12 Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Ленинград: Медгиз, 1963; 170. [Belen'kij M.L. Elementy kolichestvennoy otsenki farmakologicheskogo effekta. Leningrad: Medgiz, 1963; 170. (in Russian)]

Информация об авторах

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID: 0000-0001-6732-8404

Щукина Вероника Николаевна — к. б. н., научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID: 0000-0002-5461-3641

Савенко Сергей Владимирович — научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID: 0000-0002-5175-916X

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, академик РАН РФ, начальник института ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID: 0000-0002-6742-3919

Филин Константин Николаевич — к. ф. н., руководитель ФГУП НПЦ «Фармзащита», Московская обл., Химки, Россия

Берзин Игорь Александрович — д. м. н., профессор, начальник отдела науки и инновационных технологий в спортивной медицине ФМБА России, Москва Россия

Гладких Вадим Дмитриевич — д. м. н., зам. директора по науке ФМБА России, Москва Россия

About the authors

Svetlana Ya. Loginova — D. Sc. in Biology, leading researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0001-6732-8404

Veronika N. Shukina — Ph. D. in Biology, researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0002-5461-3641

Sergey V. Savenko — researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0002-5175-916X

Sergey V. Borisevich — D. Sc. in Biology, professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0002-6742-3919

Konstantin N. Filin — Ph. D. in Pharmaceutical Sciences, Head of the Federal State Unitary Enterprise Research & Production Center «Farmzashita» of the Federal Medical-Biological Agency, Khimki, Russian Federation

Igor A. Berzin — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Science and Innovative Technologies in Sports Medicine, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

Vadim D. Gladkikh — D.Sc. in Medicine, Deputy Director for Science, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

Ретроспективный анализ эффективности стартовой эмпирической антибактериальной терапии внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста в многопрофильном стационаре Москвы

*О. В. МУСЛИМОВА¹, М. В. ЖУРАВЛЕВА^{1,2}, О. А. ДЕМИДОВА¹,
Г. И. ГОРОДЕЦКАЯ¹, А. В. ШАПЧЕНКО³, Е. А. СОКОВА^{1,2}

¹ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

³ ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» МЗ РФ, Москва, Россия

Retrospective Analysis of the Initial Empirical Antibiotic Therapy Effectiveness for Community-Acquired Pneumonia in Young Individuals in Moscow Multidisciplinary Hospital

*OLGA V. MUSLIMOVA¹, MARINA V. ZHURAVLEVA^{1,2}, OLGA A. DEMIDOVA¹,
GALINA I. GORODETSKAYA¹, ANNA V. SHAPCHENKO³, ELENA A. SOKOVA^{1,2}

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Резюме

Несмотря на то, что заболеваемость внебольничной пневмонией (ВП) среди лиц молодого возраста существенно ниже, чем среди пациентов более старшего возраста, частота госпитализаций по поводу ВП тяжёлого течения среди лиц моложе 45 лет остаётся высокой. Эффективность и длительность лечения напрямую зависят от рационально подобранной стартовой эмпирической антибактериальной терапии (АБТ).

Цель исследования — анализ факторов, влияющих на эффективность стартовой эмпирической антибактериальной терапии ВП у лиц молодого возраста в условиях многопрофильных медицинских учреждений.

Материалы и методы. Исследование выполнено в дизайне ретроспективного обсервационного исследования; проанализировано 105 медицинских карт пациентов с ВП молодого возраста, госпитализированных в один из многопрофильных стационаров города Москвы с 2017 по 2019 гг.

Результаты. Схема эмпирической АБТ цефтриаксон + азитромицин (70% всех назначений) была неэффективна в 13,7% случаев её назначения; монотерапия цефтриаксоном (13% всех назначений) была неэффективна в 57%. В группе пациентов с неэффективностью стартовой эмпирической АБТ достоверно чаще диагностировалась ВП тяжёлого течения, острая дыхательная недостаточность, синдром системного воспалительного ответа и экссудативный плеврит. Не выявлено преобладания той или иной коморбидной патологии и Чарлсон-индекса в группах со сменой стартовой АБТ и группах без смены стартовой АБТ. Микробиологический спектр возбудителей ВП значимо не различался у пациентов молодого возраста между группами со сменой стартовой эмпирической АБТ и группой без смены стартовой АБТ.

Заключение. Причиной неэффективности стартовой эмпирической АБТ могли быть такие факторы, как недооценка риска наличия полирезистентных возбудителей; недооценка риска вирусного генеза ВП; недооценка тяжести течения ВП и осложнений ВП.

Ключевые слова: внебольничная пневмония; молодой возраст; эффективность стартовой эмпирической антибактериальной терапии

Для цитирования: Муслимова О. В., Журавлева М. В., Демидова О. А., Городецкая Г. И., Шапченко А. В., Сокова Е. А. Ретроспективный анализ эффективности стартовой эмпирической антибактериальной терапии внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста в многопрофильном стационаре Москвы. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 55–62. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-55-62>.

Abstract

Despite the fact that the incidence of community-acquired pneumonia (CAP) among young people is significantly lower than among older patients, the frequency of hospitalizations for severe CAP among people under 45 years of age remains high. The effectiveness and duration of treatment directly depend on the rationally selected initial empirical antibacterial therapy (ABT).

The aim of the study is to analyze the factors influencing the effectiveness of initial empiric antibacterial therapy for CAP in young people in multidisciplinary medical institutions.

Materials and methods. The study was designed as a retrospective observational study; it analyzes 105 medical records of young patients with CAP admitted to one of the multidisciplinary hospitals in Moscow from 2017 to 2019.

Results. The empiric ceftriaxone + azithromycin ABT regimen (70% of all prescriptions) was ineffective in 13.7% of cases; monotherapy with ceftriaxone (13% of all prescriptions) was ineffective in 57% cases. Severe CAP, acute respiratory failure, systemic inflammatory response syndrome, and exudative pleurisy were diagnosed with significantly higher frequency in the group of patients with ineffective initial empirical ABT. There was no predominance of any comorbid pathology and Charlson Comorbidity Index in groups where the initial ABT was changed and in groups without a change in initial ABT. The microbiological spectrum of CAP pathogens did not significantly differ in young patients between groups with a changed initial empirical ABT and a group without changing initial ABT.

Conclusion. The reasons for the ineffectiveness of the initial empirical ABT could be such factors as: underestimation of the risk of the presence of multidrug-resistant pathogens; underestimation of the risk of viral genesis of CAP; underestimation of the severity of CAP, as well as the severity of CAP complications.

Keywords: community-acquired pneumonia; young age; efficacy of initial empiric antibiotic therapy

For citation: Muslimova O. V., Zhuravleva M. V., Demidova O. A., Gorodetskaya G. I., Shapchenko A. V., Sokova E. A. Retrospective analysis of the initial empirical antibiotic therapy effectiveness for community-acquired pneumonia in young individuals in Moscow multidisciplinary hospital. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 55–62. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-55-62>.

Введение

Внебольничная пневмония (ВП) представляет значительную проблему для здоровья населения всех возрастных категорий, являясь в глобальном масштабе одной из ведущих причин госпитализаций и смертности [1].

Ежегодно во всём мире умирает более 3 млн человек в результате заболевания пневмонией. Это превышает смертность от других инфекционных заболеваний, включая туберкулёз, малярию и ВИЧ инфекцию [2].

Известно, что риск и тяжесть ВП, частота госпитализаций, а также частота неблагоприятных исходов ВП (смертность) значительно увеличивается с возрастом [3, 4]. Поэтому большинство клинических исследований (КИ) во всём мире направлено на изучение факторов, влияющих на течение ВП, прогнозы (которые, в первую очередь, зависят от эффективности лечения) именно у пациентов пожилого и старческого возраста. Однако, по результатам европейских эпидемиологических исследований известно, что, несмотря на то что процент молодых пациентов среди всех пациентов с ВП не очень высок, частота госпитализаций у этой категории по-прежнему остаётся значительной (55,7%) [5].

Большинство пациентов любого возраста с ВП получают стартовую эмпирическую терапию, а выбор рациональной антибактериальной терапии (АБТ) осложняется постоянно изменяющейся эпидемиологией ВП, антибиотикорезистентностью, а также различием этиопатогенов ВП между странами и регионами. С другой стороны, принятие решения о назначении АБП пациентам

требует обязательного учёта не только конкретной клинической ситуации, но и факторов риска фармакотерапии, от которых, как известно, зависят эффективность и безопасность лечения [6].

Цель работы — анализ факторов, влияющих на эффективность стартовой эмпирической антибактериальной терапии ВП у лиц молодого возраста в условиях многопрофильных медицинских учреждений.

В ходе ретроспективного исследования решались следующие задачи: изучить эффективность стартовой эмпирической АБТ ВП у лиц молодого возраста; изучить микробиологический профиль возбудителей ВП в многопрофильном стационаре города Москвы; изучить и проанализировать факторы, влияющие на эффективность АБТ ВП.

Материал и методы

Оценка эффективности стартовой эмпирической антибактериальной терапии ВП у лиц молодого возраста в условиях многопрофильных медицинских учреждений выполнена в дизайне ретроспективного обсервационного исследования.

Проводился анализ первичной медицинской документации (медицинские карты и листы назначения лекарственных средств и процедур — архивный материал) у лиц молодого возраста с внебольничной инфекцией нижних дыхательных путей.

Статистическая обработка полученных в ходе исследования результатов проводилась с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft®, США) и Social science statistics.

Значимость различий частот определяли с помощью критерия χ^2 Пирсона. При проведении корреляционного анализа рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Различия и корреляции считались достоверными при $p < 0,05$. При использовании коэффициента ранговой корреляции Спирмена условно оценивали силу связи между признаками, считая значения коэффициента меньше 0,3 — при-

знаком слабой силы связи; значения более 0,3, но менее 0,7 — признаком средней силы связи, а значения 0,7 и более — признаком высокой силы связи.

Критериями включения в наблюдательное ретроспективное исследование были: заключительный диагноз при выписке из стационара — ВП; молодой возраст (от 18 до 44 лет — по классификации ВОЗ)¹; наличие в схемах АБТ препаратов из группы бета-лактамов — цефалоспоринов.

На основании данных первичной медицинской документации заполнялась специально разработанная индивидуальная регистрационная карта (ИРК) пациента, включавшая: демографические данные (пол, возраст); анамнестические данные, аллергологический анамнез; коморбидность; предшествующая АБТ; данные объективного осмотра, лабораторные параметры пациента (общий анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи, клинический анализ мокроты до/после лечения); данные микробиологического исследования, антибиотикограмма и инструментальные методы исследования (рентгенологическое исследование органов грудной клетки, КТ, МРТ, ЭКГ, ЭХО-КТ, УЗИ органов брюшной полости), диагнозы при поступлении и выписке (основной, сопутствующие диагнозы, осложнения). Подробно анализировались схемы АБТ.

Эффективность проводимой терапии оценивалась по динамике клинических симптомов и показателей физикального осмотра, а также по динамике показателей лабораторно-инструментальных методов обследования. Первичным критерием оценки эффективности стартовой АБТ была нормализация температуры в течение 48–72 ч от начала фармакотерапии.

Обнаруживаемые в посевах мокроты *Streptococcus viridans* и *Candida albicans* в низких титрах расценивали как контаминацию из верхних дыхательных путей.

Результаты и обсуждение

В исследование были включены материалы 105 медицинских карт и листов назначения лекарственных средств и процедур пациентов с верифицированным диагнозом ВП (77 (73,3%) мужчин и 28 (26,7%) женщин в возрасте от 18 до 44 лет (средний возраст — $31,9 \pm 7,3$)), госпитализированных в ГБУЗ «Городская клиническая больница им. И. В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 2017 г. по 2019 г., которым в качестве стартовой терапии назначалась моно- и/или комплексная терапия, включающая антибиотик цефалоспоринового ряда.

Среди госпитализированных пациентов 38 человек были с тяжёлым течением ВП и 67 человек — с нетяжёлым течением ВП. Средняя продолжительность пребывания в стационаре пациентов с ВП по группе в целом составила $11,09 \pm 4,67$ дней. Среди пациентов с ВП тяжёлого и нетяжёлого течения преобладали мужчины (76,0 и 70,0%, соответственно).

Самыми частыми стартовыми схемами эмпирической АБТ была схема, включавшая цефтриаксон + азитромицин (73 человек — 70% всех назначений) и монотерапия цефтриаксоном (14 человек — 13% всех назначений) (рис. 1).

Стартовая схема цефтриаксон + азитромицин была неэффективна в 13,7% случаев её назначения,

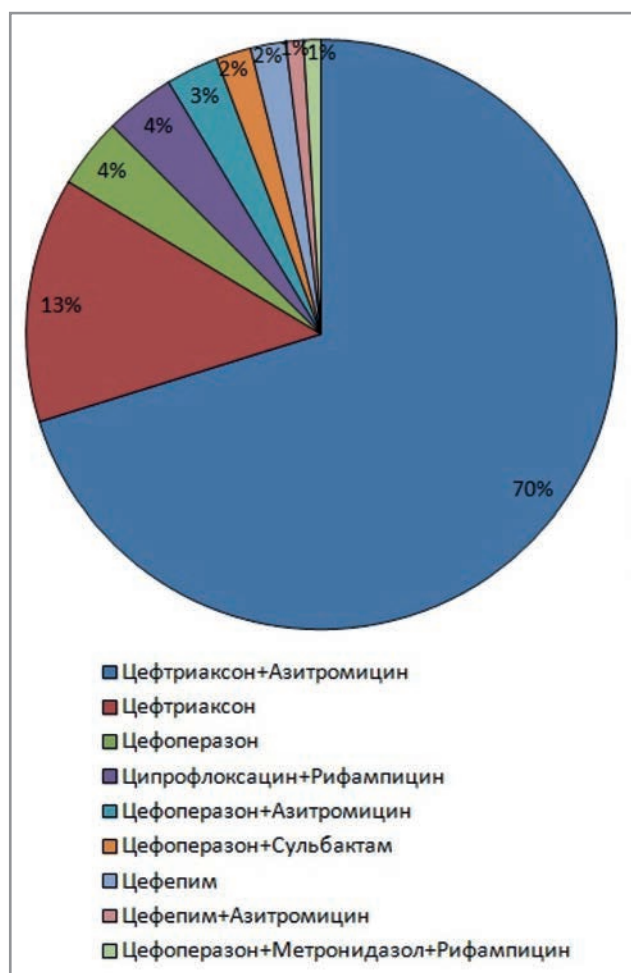


Рис. 1. Схемы стартовой АБТ в исследуемой группе.
Fig. 1. Starting ABT designs in the study group.

и, как правило, не требовала смены АБТ ($p=0,024$). Монотерапия цефтриаксоном была неэффективна в 57% случаев назначения, данная схема достоверно чаще требовала смены ($p=0,065$).

С целью оценки эффективности стартовой АБТ, а также выявления и анализа факторов, влияющих на эффективность стартовой эмпирической АБТ в группе молодых пациентов с ВП было выделено две группы: пациенты, которым проводилась смена стартовой схемы АБТ (А) (стартовая АБТ неэффективна) и пациенты, у которых схема стартовой АБТ не менялась (В) (стартовая АБТ эффективна). В группу А вошло 35 пациентов, что составило 33,3% от общего числа выборки; в группу В вошло 70 пациентов, что составило 66,7% от общего числа выборки.

Мы провели сравнение группы А и В, и проанализировали факторы, которые могли повлиять на эффективность АБТ ВП у лиц молодого возраста: пол, вредные привычки, тяжесть течения ВП, наличие осложнений, количество, виды и тя-

¹ <https://www.who.int/standards>

Характеристика пациентов в группах со сменой стартовой схемы АБТ (А) и без смены стартовой схемы АБТ (В)
Characteristics of patients in groups with a change in the initial ABT regimen (A) and without a change in the initial ABT regimen (B)

Факторы, влияющие на выбор стартовой АБТ	Группа А, n=35	Группа В, n=70	p
Пол			
Муж	27 (77%)	50 (71%)	p=0,64
Жен	8 (23%)	20 (29%)	p=0,7
Возраст	32 года	30 лет	
Тяжесть ВП			
Тяжёлая ВП	21 (60%)	17 (24%)	p=0,0005
Нетяжёлая ВП	14 (40%)	53 (76%)	p=0,0003
Осложнения			
ССВО	14 (40%)	6 (8,6%)	p=0,0003
ОДН	5 (14,3%)	3 (4,3%)	p=0,07
Плеврит	10 (28,5%)	4 (5,7%)	p=0,001
Абсцесс лёгкого	1 (2,8%)		
Курение	19 (54,2%)	27 (38,6%)	p=0,15
Злоупотребление алкоголем	1 (5,3%)	1 (1,4%)	p=0,9
Наркомания	2 (10,5%)	3 (4,3%)	p=1,0
Предшествующая АБТ в течение >2 дней за последние 90 дней перед госпитализацией	4	19	p=0,028
Коморбидные заболевания	13 (37%)	25 (35,7%)	Нд
АГ	5	7	p=0,53
БА	5	6	p=0,5
Вирусные гепатиты	3	6	p=1,0
ВИЧ (СПИД)	1	1	
Язвенная болезнь	1	1	
Анемия	1	1	
Синуситы		2	
ЦВБ (ОНМК)		1	
Ожирение		2	
Хронический панкреатит	2		
Эпилепсия		1	
Злокачественные новообразования		1	
Схемы стартовой АБТ			
Цефтриаксон+Азитромицин	19 (54,3%)	54 (74%)	p=0,024
Цефтриаксон	8	6	p=0,065
Цефоперазон	4	0	
Ципрофлоксацин+Рифампицин	2	2	
Цефоперазон+Азитромицин	1	2	
Цефоперазон+Сульбактам	0	2	
Цефепим	1	1	
Цефепим+Азитромицин	1	0	
Цефоперазон+Метронидазол+Рифампицин	0	1	

жесть коморбидной патологии, микробиологический спектр (табл. 1).

Группа А и группа В были сопоставимы по гендерному составу и по возрасту. В группе А доля курильщиков была недостоверно больше, чем в группе В — 54,2% (19 человек из 35) против 38,6% (27 человек из 70) в группе В (p=0,15). Группа А и группа В статистически достоверно не отличались по числу пациентов с наркотической зависимостью: в группе А выявлено 2, а в группе В 3 пациента с наркотической зависимостью (p=1,0).

Группа А и группа В статистически достоверно отличались по количеству случаев тяжёлой ВП: тяжёлая пневмония диагностировалась чаще в группе А по сравнению с группой В (p=0,0005) (рис. 2). То есть, чем тяжелее протекает ВП, тем риск неэффективности стартовой эмпирической

терапии выше. Однако корреляционной связи по указанным параметрам выявлено не было.

Группа А и В статистически значимо отличалась по количеству случаев синдрома системного воспалительного ответа (ССВО). ССВО диагностировался чаще в группе А по сравнению с группой В (p=0,0003). В группе А ССВО диагностирован у 40% пациентов (14 человек из 35), в то время как в группе В ССВО диагностирован всего у 8,6% (6 человек из 70). Таким образом, 70% всех случаев ССВО в выборке приходилось на группу А. Корреляционной связи по указанным параметрам не выявлено.

Установлено, что группы А и В статистически значимо отличались по количеству случаев экссудативного плеврита и острой дыхательной недостаточности (ОДН). Экссудативный плеврит

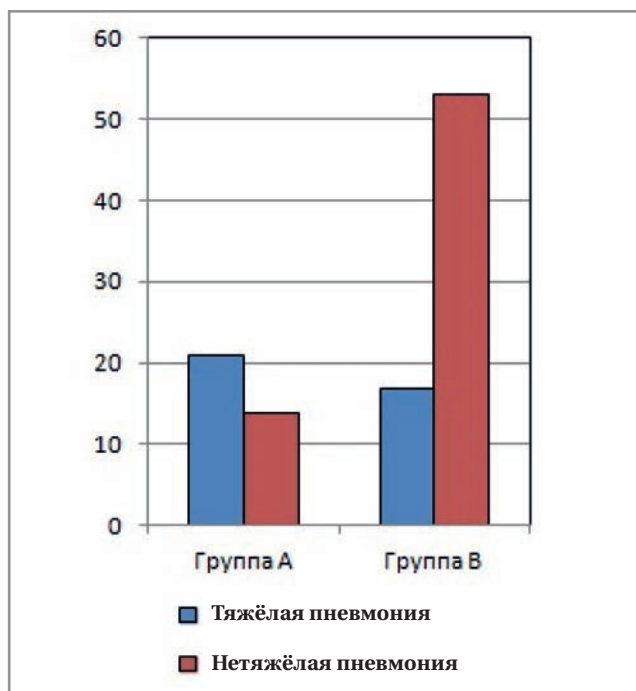


Рис. 2. Соотношение случаев тяжёлой и нетяжёлой пневмонии в группах со сменой стартовой эмпирической АБТ и без смены стартовой эмпирической АБТ.
Fig. 2. The ratio of severe and non-severe pneumonia cases in groups with and without a change in the initial empiric ABT.

выявлялся чаще в группе А по сравнению с группой В (71 и 5,7%, соответственно, $p=0,001$). Осложнения в виде ОДН также чаще встречались в группе А (62,5%) по сравнению с группой В ($p=0,07$). Корреляционной связи по указанным параметрам не выявлено. Абсцесс лёгкого диагностирован у 1 пациента в группе А. Группы А и В не отличались между собой по количеству случаев кровохарканья ($p=0,42$).

Пациентов, получавших АБТ в течение >2 дней за последние 90 дней перед госпитализацией, было статистически значимо больше в группе В, чем в группе А ($p=0,028$).

Из 105 человек, включённых в исследование, сопутствующие заболевания выявлены у 33 пациентов, что составляет 31,4% всей выборки. В группе А коморбидные заболевания выявлены у 13 пациентов из 35 (у 37%), в группе В — у 25 из 70 (у 35,7%).

Выявленные сопутствующие заболевания в исследуемой группе пациентов распределились таким образом: артериальная гипертензия выявлена у 11,4% пациентов; бронхиальная астма — у 10,5%; вирусный гепатит — у 8,6%; ВИЧ — у 1,9%; язвенная болезнь — у 1,9%; анемии — у 1,9%; синуситы — у 1,9%; хронический панкреатит — у 1,9%; ожирение — у 1,9%; цереброваскулярная болезнь (ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения) — у 0,95%; злокачественные

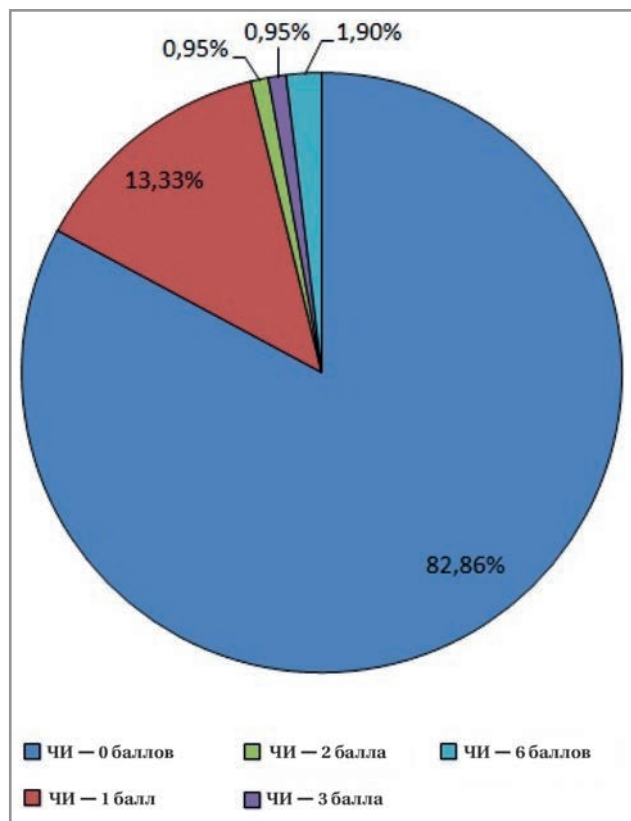


Рис. 3. Чарлсон-индекс (ЧИ).

Fig. 3. Charlson Comorbidity Index (CCI).

новообразования — у 0,95%; эпилепсия — у 0,95% пациентов. По результатам исследования не было выявлено преобладания той или иной коморбидной патологии в группе со сменой стартовой АБТ и группе без смены стартовой АБТ.

Мы оценивали коморбидность с помощью индекса коморбидности Чарлсон (ЧИ), представляющего собой балльную систему оценки наличия сопутствующих заболеваний [7] (рис. 3).

Было установлено, что Чарлсон-индекс достоверно не отличался в двух группах. В обеих группах преобладал Чарлсон-индекс 0 баллов (83%), что свидетельствовало о низком уровне коморбидности и тяжести сопутствующих заболеваний в нашей выборке.

Для верификации возбудителя ВП проводились посевы мокроты с определением чувствительности выявленных микроорганизмов к определённым АБП. Посев мокроты производился в 88,6% случаев (т. е. у 93 пациентов из 105). Этиологически значимые возбудители ВП выявлены у 23 пациентов, что составило 24,7% от общего числа посевов. Это несколько меньше количества выявляемых этиопатогенов при ВП по данным литературы. Несмотря на использование молекулярных и других микробиологических методов диагностики, этиологически значимый микроорганизм может быть выявлен только в половине случаев ВП [8]. По результатам международного

исследования GLIMP (Global Initiative for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia), 3217 пациентам с ВП проводилось микробиологическое тестирование (хотя бы один из тестов), включая посевы культуры крови, мокроты, культуры бронхо-альвеолярного лаважа, плевральной жидкости, исследование на вирусный генез пневмонии, тесты по выявлению пневмококковой и легионеллезной антигенурии, острофазовые серологические тесты. Выявить патоген удалось лишь в 36,5% случаев (у 1173 пациентов) [9].

В нашем исследовании распределение всех выявленных возбудителей было следующим: *Streptococcus pneumoniae* — 15 (55,5%), *Klebsiella pneumoniae* — 5 (18,5%), *Klebsiella pneumoniae* БЛРС + — 3 (11,1%), *Escherichia coli* — 2 (7,4%), *Pseudomonas aeruginosa* — 1 (3,7%), *Haemophilus influenza* — 1 (3,7%) (рис. 4). У троих пациентов выявлены ассоциации возбудителей ВП, что составило 11,1% всех выявленных этиопатогенов. В группе со сменой стартовой АБТ у одного пациента выявлена ассоциация возбудителей (*Streptococcus pneumoniae* + *Escherichia coli*). В группе без смены стартовой АБТ у двоих пациентов выявлены ассоциации возбудителей (*Klebsiella pneumoniae* БЛРС + и *Streptococcus pneumoniae*; *Klebsiella pneumoniae* + *Streptococcus pneumoniae*).

Как известно, самыми частыми возбудителями ВП в мире являются *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella* sp. и респираторные вирусы [10, 11]. Однако эти данные отражают микробиологический профиль, характерный для пациентов всех возрастных категорий старше 18 лет (то есть пациентов молодого, среднего, пожилого и старческого возраста) как амбулаторного, так и стационарного звена.

Полученные в нашем исследовании результаты микробиологического тестирования можно объяснить тем, что из существующих анализов для установления возбудителей ВП в стационаре, включённом в наше исследование, применялись только посевы мокроты. То есть, не проводилась ПЦР-диагностика вирусной пневмонии, тесты на выявление легионеллезной и пневмококковой антигенурии, острофазовые серологические тесты для выявления микоплазм, хламидий и легионелл и т. д. Безусловно, микробиологический спектр возбудителей ВП имеет также региональные особенности. Так, например, в крупном многоцентровом исследовании, проведённом в Испании, возбудители ВП, по результатам посевов мокроты, у пациентов с ВП моложе 45 лет (без учёта возбудителей атипичной пневмонии и респираторных вирусов) распределились таким образом: на первом месте после пневмококков по частоте были *H. influenzae*, далее следовал *S. aureus*, далее *Paeruginosa*, далее Enterobacteriaceae; бактерий, проду-

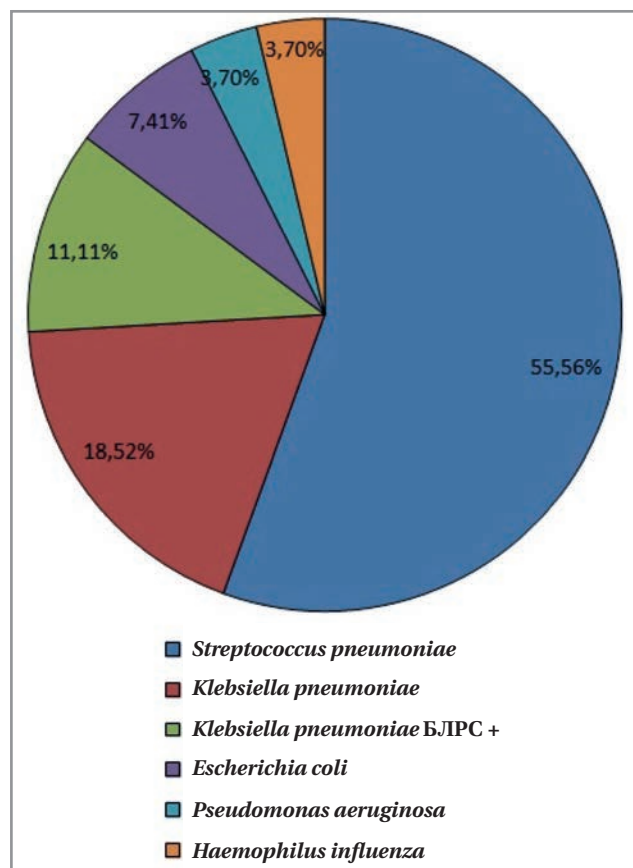


Рис. 4. Микробиологический спектр возбудителей ВП в исследуемой группе молодых пациентов.

Fig. 4. Microbiological spectrum of CAP pathogens in the study group of young patients.

цирующих БЛРС или других полирезистентных возбудителей, не выявлено [12].

Мы сравнили частоту выявления этиопатогенов в группе со сменой стартовой АБТ (группа А) и в группе без смены стартовой АБТ (группа В): доля этиопатогенов ВП в группе А составила 37,5% от общего числа посевов ($n=32$), доля этиопатогенов в группе В составила 21,3% от общего числа посевов ($n=61$). То есть, в группе А выявить возбудителя пневмонии удавалось достоверно чаще, чем в группе В ($p=0,15$).

Микробиологический спектр возбудителей ВП значимо не различался у пациентов молодого возраста между группами со сменой стартовой эмпирической АБТ (группа А) и группой без смены стартовой АБТ (группа В), то есть количество тех или иных выявленных этиопатогенов значимо не отличалось между группами, то есть возбудители ВП и их соотношение в обеих группах были схожи.

Обращает на себя внимание высокий процент энтеробактерий (37% из 27 выявленных этиопатогенов), наличие бактерий, продуцирующих БЛРС, а также ассоциаций микроорганизмов в посевах мокроты пациентов с ВП, включённых в наше исследование. В международном исследовании, про-

ведённом в 50 странах, установлено, что факторами риска ВП, вызванной энтеробактериями, выступают: мужской пол, тяжёлая пневмония, дефицит массы тела и перенесённая ранее инфекция, вызванная бактериями, продуцирующими БЛРС. Кроме того, факторами риска ВП, вызванной бактериями, продуцирующими БЛРС, являются: дефицит массы тела, сердечно-сосудистые заболевания и госпитализация в течение последних 12 мес. [13]. Однако в нашем исследовании не во всех медицинских картах обнаруживались данные о предшествующих госпитализациях, АБТ в течение предшествующих 90 дней, в/в терапии, наличии сеансов диализа или лечения ран в домашних условиях в предшествующие 30 дней, а также антропометрические данные. Таким образом, оценить влияние этих факторов на риск развития ВП, вызванной полирезистентными микроорганизмами или энтеробактериями, не представляется возможным. Кроме того, в медицинской документации нет указаний на сбор эпидемиологического анамнеза для выявления контактов с больными респираторной вирусной инфекцией для исключения вирусного генеза ВП. А, как известно, причиной 25% случаев ВП является вирусная инфекция, и это может быть причиной плохого «ответа» на АБТ [14].

Таким образом, в результате проведённого анализа установлено, что у пациентов молодого возраста с ВП тяжёлого течения и у пациентов с такими осложнениями ВП, как ССВО, ОДН, экссудативный плеврит, эффективность стартовой эмпирической АБТ ВП была достоверно ниже по сравнению с пациентами молодого возраста с ВП лёгкого течения и протекающей без вышеуказанных осложнений. Можно предположить, что у 26% пациентов молодого возраста из группы, получавших цефтриаксон+азитромицин, и у 43% пациентов молодого возраста из группы, получавших монотерапию цефтриаксоном была обусловлена наличием этиопатогенов, резистентных к данным АБП. По данным исследований МАКМАХ, проведённых в период с 2017 г. по 2019 г. в терапевтических отделениях ЛПУ города Москвы среди госпитализированных пациентов с ВП молодого возраста (с 18 до 44 лет), в которых определялась чувствительность/резистентность *S.pneumoniae*, как самого распространённого возбудителя ВП, к различным АБП: чувствительность к цефтриаксону составила

100%, к азитромицину — 42,86%. При анализе результатов посевов мокроты в рамках нашего исследования выявлено, что *S.pneumoniae* стал причиной ВП у 15 пациентов, в 14 случаях (93,3%) он был чувствителен к макролидам (проверяется *in vitro* эритромицином), в 12 случаях у пневмококка выявлена резистентность к бензилпенициллину. Таким образом, в нашей выборке процент чувствительных к макролидам штаммов *S.pneumoniae* оказался выше, чем по данным литературы. Чувствительность *S.pneumoniae* к цефтриаксону исследовалась лишь в одном посеве: пневмококк, выделенный из мокроты пациента из группы со сменой стартовой эмпирической АБТ, был чувствителен к цефтриаксону и эритромицину и резистентен к бензилпенициллину.

Заключение

Причинами неэффективности стартовой эмпирической АБТ в нашем исследовании могли быть такие факторы, как недооценка риска наличия полирезистентных возбудителей, недооценка риска вирусного генеза ВП; недооценка тяжести течения ВП и определённых осложнений ВП.

Дополнительная информация

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Муслимова О. В. — идея исследования, набор и систематизация архивного материала, анализ литературы, написание и редактирование текста, формулировка выводов; Сокова Е. А. — систематизация и анализ данных литературы, критический пересмотр текста статьи; Демидова О. А. — набор и систематизация архивного материала, анализ данных литературы; Гордецкая Г. И. — набор и систематизация архивного материала, анализ литературы, написание текста статьи; Шапченко А. В. — написание текста, систематизация и анализ данных литературы; Журавлева М. В. — участие в разработке концепции исследования, формулировка выводов.

Литература/References

- Sharma R., Sandrock C.E., Meehan J., Theriault N. Community-acquired bacterial pneumonia — changing epidemiology, resistance patterns, and newer antibiotics: spotlight on delafloxacin. Clin Drug Investig. 2020; 40 (10): 947–960. doi: 10.1007/s40261-020-00953-z.
- World Health Organisation. The top 10 causes of death 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Ticona J. H., Zacccone V. M., McFarlane I. M. Community-acquired pneumonia: a focused review. Am J Med Case Rep. 2021; 9 (1): 45–52. doi: 10.12691/ajmcr-9-1-12.
- Han X., Liu X., Chen L. et al. Disease burden and prognostic factors for clinical failure in elderly community acquired pneumonia patients. BMC Infect Dis. 2020; 20 (1): 668. Published 2020 Sep 12. doi: 10.1186/s12879-020-05362-3.
- Klapdor B., Ewig S., Pletz M. W., Rohde G., Schütte H., Schaberg T., Welte T., CAPNETZ Study Group. Community-acquired pneumonia in younger patients is an entity on its own. Eur Respir J. 2012 May; 39 (5): 1156–1161. doi: 10.1183/09031936.00110911.
- Сидоренко С.В., Яковлев С.В., Спичак Т.В. и др. Стратегия и тактика рационального применения антимикробных средств в амбулаторной практике. Евразийские клинические рекомендации. Пе-

² <https://amrbook.ru/organisms/4>

- диатрия (Приложение к журналу Consilium Medicum). 2017; 1: 17–25. [Sidorenko S.V., Yakovlev S.V., Spichak T.V. et al. Strategy and tactics of the rational use of antimicrobial drugs in outpatient practice. Eurasian clinical guidelines. 2016. Pediatrics (Suppl. Consilium Medicum). 2017; 1: 17–25. (in Russian)]
7. Charlson M.E., Pompei P., Ales K.L. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chronic Dis. 1987; 40 (5): 373–383. doi: 10.1016/0021-9681(87)90171-8.
 8. Зырянов С.К., Ченкуров М.С., Ивжиц М.А., Батечко Ю.А., Иванова Е.Б., Якунина М.А. Исследование структуры сопутствующих заболеваний и этиологии внебольничной пневмонии у пациентов пожилого и старческого возраста. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (3): 242–248. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2020.3.242-248>. [Zyryanov S.K., Chenkurov M.S., Ivzhits M.A., Batechko Yu.A., Ivanova E.B., Yakunina M.A. Etiology of community-acquired pneumonia and prevalence of comorbidities in elderly patient population. Klinicheskaya Microbiologiya i Antimicrobnaia Himioterapiya. 2020; 22 (3): 242–248. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2020.3.242-248>. (in Russian)]
 9. Carugati M., Aliberti S., Reyes L.F. et al. Microbiological testing of adults hospitalised with community-acquired pneumonia: an international study. ERJ Open Res. 2018; 4 (4): 00096. doi: 10.1183/23120541.00096-2018.

Информация об авторах

Муслимова Ольга Валерьевна — к. м. н., аналитик 1 категории Отдела подготовки фармакопейных статей на биологические лекарственные средства Института фармакопей и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-1009-9609

Журавлева Марина Владимировна — д. м. н., профессор, заместитель начальника научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-9198-8661. eLIBRARY SPIN-код: 6267-9901. Scopus Author ID: 55878917900

Демидова Ольга Александровна — к. ф. н., аналитик 1 категории Отдела подготовки фармакопейных статей на биологические лекарственные средства Института фармакопей и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0123-3044. eLIBRARY SPIN-код: 3065-3567

Городецкая Галина Ивановна — ведущий аналитик научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-7322-3323

Шапченко Анна Валерьевна — к. м. н., доцент кафедры госпитальной терапии № 2 ФГБУ ВО «Московского государственного медико-стоматологического университета им. А. И. Евдокимова, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4856-9346

Сокова Елена Андреевна — к. м. н., доцент, ведущий аналитик Отдела подготовки фармакопейных статей на биологические лекарственные средства Института фармакопей и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; доцент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-6389-2099

10. Aliberti S., Kaye K.S. The changing microbiologic epidemiology of community-acquired pneumonia. Postgrad Med. 2013; 125 (6): 31–42. doi: 10.3810/pgm.2013.11.2710.
11. Минздрав РФ. Клинические рекомендации «Внебольничная пневмония у взрослых». Год утверждения клинических рекомендаций (частота пересмотра): 2019 (пересмотр каждые 3 года). Российское респираторное общество. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. С.97. [Ministry of Health of the Russian Federation. Clinical guidelines «Community-acquired pneumonia in adults». Year of approval of the guidelines (revision frequency): 2019 (revision every 3 years). Russian Respiratory Society. Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 97 s. (in Russian)]
12. Sahuquillo-Arce J.M., Menéndez R., Méndez R., Amara-Elori I., Zalacain R., Capelastegui A. et al. Age-related risk factors for bacterial aetiology in community-acquired pneumonia. Respirology. 2016 Nov; 21 (8): 1472–1479. doi: 10.1111/resp.12851.
13. Villafuerte D., Aliberti S., Soni N.J. et al. Prevalence and risk factors for Enterobacteriaceae in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. Respirology 2020; 25 (5): 543–551. doi: 10.1111/resp.13663. Epub 2019 Aug 5.
14. Kaysin A., Viera A.J. Community-Acquired Pneumonia in Adults: Diagnosis and Management. American family physician. 94 (9): 698–706.

About the authors

Olga V. Muslimova — Ph. D. in Medicine, 1st category Analyst at the Department for the Preparation of Pharmacopoeia Articles for Biological Medicinal Products of the Institute of Pharmacopoeia and Standardization in the Sphere of Medicines Circulation, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-1009-9609

Marina V. Zhuravleva — D. Sc. in Medicine, Professor, Deputy Head of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation; Professor at the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-9198-8661. eLIBRARY SPIN: 6267-9901. Scopus Author ID: 55878917900

Olga A. Demidova — Ph. D. in Pharmaceutical Sciences, 1st category Analyst at the Department for the Preparation of Pharmacopoeia Articles for Biological Medicinal Products of the Institute of Pharmacopoeia and Standardization in the Sphere of Medicines Circulation, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-0123-3044. eLIBRARY SPIN: 3065-3567

Galina I. Gorodetskaya — Leading Analyst at the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-7322-3323

Anna V. Shapchenko — Ph. D. in Medicine, Associate Professor at the Department of Hospital Therapy No. 2, A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4856-9346

Elena A. Sokova — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, Leading Analyst at the Department for the Preparation of Pharmacopoeial Articles for Biological Medicinal Products of the Institute of Pharmacopoeia and Standardization in the Sphere of Medicines Circulation, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation; Associate Professor at the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-6389-2099

Антимикробная терапия и COVID-19 — «великое противостояние»

*А. А. ЗАЙЦЕВ^{1,2}, А. М. МАКАРЕВИЧ³

¹ Главный военный клинический госпиталь им. Н. Н. Бурденко, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «МГУПП» Медицинский институт непрерывного образования, Москва, Россия

³ ФГКУ «301 военный клинический госпиталь» МО РФ, Хабаровск, Россия

Antimicrobial Therapy and COVID-19 — the 'Great Confrontation'

*ANDREY A. ZAYTSEV^{1,2}, ANDREY M. MAKAREVICH³

¹ Main Military Clinical Hospital named after academician N. N. Burdenko of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Moscow State University of Food Production — Medical Institute of Continuous Education, Moscow, Russia

³ 301st Military Clinical Hospital of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Khabarovsk, Russia

Резюме

Проблема антимикробной терапии (АМТ) при новой коронавирусной инфекции с момента её возникновения и до настоящего времени является краеугольным камнем практического здравоохранения. Мы обобщили ряд проблем с неоправданным назначением АМТ, по данным зарубежных и отечественных исследований и реальной клинической практики. С одной стороны, вирусное поражение лёгочной ткани при COVID-19 трудно отличить от внебольничной или вторичной бактериальной пневмонии и вызывает у клиницистов желание предупредить возможные бактериальные осложнения со стороны лёгких, назначая с первого дня антимикробные препараты широкого спектра. С другой стороны, наличие чётких клинических и биологических маркеров бактериальной пневмонии и COVID-19 позволяют не использовать в рутинной практике антибиотики, по крайней мере на ранних этапах лечения. Внедрение в повседневную клиническую практику определения биомаркера бактериальной инфекции прокальцитонина при COVID-19 имеет осознанный, методический, научный подход к назначению антибиотиков.

Ключевые слова: COVID-19; антимикробная терапия; биомаркеры воспалительного ответа; прокальцитонин

Для цитирования: Зайцев А. А., Макаревич А. М. Антимикробная терапия и COVID-19 — «великое противостояние». *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 63–68. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-63-68>

Abstract

The problem of antimicrobial therapy (AMT) for the new coronavirus infection has been the cornerstone of practical health-care since its emergence to the present day. The article summarizes a number of problems concerning the unjustified prescription of AMT based on the data of foreign and domestic studies, as well as actual clinical practice. On the one hand, viral damage to the lung tissue during COVID-19 is difficult to distinguish from community-acquired or secondary bacterial pneumonia; it prompts clinicians to prevent possible bacterial complications in the lungs by prescribing broad-spectrum antibiotics starting from the first day. On the other hand, the presence of clear clinical and biological markers of bacterial pneumonia; and COVID-19 makes it possible not to use antibiotics in routine practice, at least in the early stages of treatment. The introduction of procalcitonin as a biomarker of bacterial infection in COVID-19 into everyday clinical practice has a reasonable, methodical, and scientific approach to prescribing antibiotics.

Keywords: COVID-19; antimicrobial therapy; inflammatory biomarkers; procalcitonin

For citation: Zaitsev A. A., Makarevich A. M. Antimicrobial therapy and COVID-19 — the «great confrontation». *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 9–10: 63–68. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-63-68>

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 является наиболее актуальной проблемой практического здравоохранения. Следует признать, что до настоящего времени, несмотря на впечатляющие успехи в создании вакцин, новых про-

тивовирусных препаратов, заболеваемость имеет вспыхивающий характер с чрезвычайно быстрым распространением, а летальность в случае тяжёлого течения остаётся крайне высокой [1, 2]. Кроме того, на наш взгляд, серьёзная проблема

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Волоколамское шоссе, 11, МГУПП, г. Москва, Россия, 125080. E-mail: a-zaitcev@yandex.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 11 Volokolamskoe highway, Moscow State University of Food Production, Moscow, 125080 Russian Federation. E-mail: a-zaitcev@yandex.ru

состоит в отсутствии чёткого понимания практическими врачами сути заболевания. Нет конкретных и понятных алгоритмов фармакотерапии, что ведёт к нерациональным режимам лечения и неправильному применению антимикробных препаратов [3, 4].

Важнейшим является вопрос терминологии, а именно упоминание «пневмонии» в случае COVID-19, протекающей с поражением лёгких. Очевидно, что этот термин не отражает те клинические, рентгенологические, лабораторные и морфологические признаки патологического процесса, который наблюдается при поражении лёгких SARS CoV-2 [2–4]. С практической точки зрения это имеет большое значение, так как именно термин «пневмония» нередко приводит к неоправданно широкому применению антимикробной терапии больным с COVID-19, при отсутствии у них объективных признаков бактериальной инфекции. Поэтому наиболее правильной трактовкой клинической ситуации является формулировка клинического диагноза, указывающая именно на вирусное поражение лёгких при COVID-19 [2–4].

Это позволяет расставить приоритеты в выборе тактики ведения больного. Сегодня мы имеем чёткое представление о фазах и периодах COVID-19, и те целевые точки, на которые должна быть сфокусирована наша терапия. И такая формулировка диагноза даёт полное представление о заболевании, а специалист получает достаточно информации для обоснования и начала стартовой терапии. Период репликации вируса и появления первых симптомов заболевания оправдывает раннее назначение противовирусных средств и/или моноклональных антител (МКА). А далее либо пациент выздоравливает, либо переходит в фазу поражения лёгких (гипериммунную фазу) с развитием всевозможных осложнений, включая и бактериальные осложнения, когда и очевидна надёжная и оправданная роль антимикробной терапии [5]

Поэтому, на наш взгляд наиболее верными с учётом современных знаний о новой коронавирусной инфекции являются следующие клинические варианты COVID-19:

- инаппарантная (субклиническая) форма;
- острая респираторная вирусная инфекция лёгкого течения;
- вирусное поражение лёгких (с указанием площади изменений по визуальной шкале) без дыхательной недостаточности;
- вирусное поражение лёгких с дыхательной недостаточностью (вирусное поражение других органов и систем);
- осложнения: острый респираторный дистресс синдром (ОРДС), острая дыхательная недостаточность (ОДН), нозокомиальная пневмо-

ния, тромбозы/тромбоэмболии артерий и/или вен, синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания и др.

Приводим пример формулировки **клинического диагноза**:

Основное заболевание: новая коронавирусная инфекция COVID-19 (подтверждённая), тяжёлое течение. Двустороннее вирусное поражение лёгких (КТ-3, 60%). U07.1

Осложнения: ОРДС, ОДН. Нозокомиальная деструктивная пневмония, вызванная *Klebsiella pneumoniae*.

Проблема антибиотикотерапии при новой коронавирусной инфекции с момента её возникновения и до настоящего времени является краеугольным камнем практического здравоохранения. По данным ряда исследований, более 90% пациентов с COVID-19 в настоящее время получают антибиотики, в том числе комбинированную терапию и парентеральные препараты в амбулаторных условиях [6–8]. Вызывает очень серьёзное беспокойство тот факт, что на фоне пандемии новой коронавирусной инфекции в России отмечен значительный рост продажи антибактериальных препаратов в аптеках и закупок их лечебными учреждениями. Вне всякого сомнения, сложившаяся ситуация будет способствовать значительному росту антимикробной резистентности и иметь серьёзные неблагоприятные последствия в будущем. Необоснованная антибактериальная терапия приводит к ряду нежелательных явлений, которые могут значительно ухудшить состояние пациента, а порой и привести к жизнеугрожающим последствиям.

В связи с этим рядом медицинских профессиональных организаций [9] неоднократно упоминалось, что антибактериальные препараты не активны в отношении вирусов, в том числе в отношении нового коронавируса (SARS-Cov-2). Поэтому COVID-19, как и любая другая вирусная инфекция, не является показанием для применения антибиотиков. Поражение лёгких при COVID-19 может быть связано с иммунными механизмами — синдромом активации макрофагов с развитием «цитокинового шторма», на который антибактериальные препараты не оказывают воздействия. Повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) и ряда других лабораторных маркеров воспаления у пациентов с COVID-19 в подавляющем числе случаев обусловлено развитием «гипериммунного ответа» и не может рассматриваться как признак бактериального осложнения и, соответственно, как повод для назначения антибактериальной терапии. Единственным лабораторным маркером, позволяющим дифференцировать бактериальный и иммунный процесс у пациента с COVID-19, является уровень прокальцитонина (ПКТ) в сыроворотке крови.

В данном контексте, стоит заметить, что определение биомаркеров воспаления является весьма перспективным направлением, позволяющим проводить дифференциальную диагностику, оценивать эффективность терапии и даже определять оптимальную продолжительность назначения антибиотиков при бактериальных инфекциях. На наш взгляд, COVID-19 является уникальной моделью для понимания необходимости широкого внедрения в клиническую практику определения биомаркеров, но при этом и заставляет вдумчиво подходить к интерпретации показателей в соответствии с клинической картиной заболевания. Так, широко известно, что уровень СРБ коррелирует с тяжестью течения, распространённостью воспалительной инфильтрации и прогнозом при внебольничной бактериальной пневмонии ВП [10, 11].

В целом ряде международных и национальных рекомендаций по ведению пациентов с внебольничной пневмонией отмечается, что у пациентов с неопределённым диагнозом, при концентрации СРБ > 100 мг/л его специфичность в подтверждении бактериальной пневмонии превышает 90% [10]. Напротив, при концентрации СРБ < 20 мг/л диагноз пневмонии является маловероятным. В данном контексте пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, с одной стороны, заставляет нас перевернуть наше клиническое мышление «с ног на голову» [3], с другой — позволяет широко использовать данные возможности для правильного лечения пациентов. Так, до определённого времени СРБ и в случае COVID-19 рассматривался, в том числе, как маркер присоединения бактериальной инфекции, требующей применения антибиотиков. Однако мы уже понимаем, что в данной ситуации, СРБ является основным лабораторным маркером активности «основного» процесса, то есть системного воспаления, инициированного коронавирусной инфекцией [2–4].

Результаты многочисленных исследований показывают, что существует прямая корреляция между уровнями СРБ у пациентов с COVID-19 с тяжестью течения заболевания и их исходами. А, по нашим данным, повышенный уровень СРБ коррелирует с высоким уровнем D-димера, ферритина. Поэтому повышение уровня СРБ, наряду с другими критериями, является прекрасным основанием для привлечения противовоспалительной терапии (левилимаб, тоцилизумаб, глюкокортикостероиды (ГКС)) [2–4, 12]. Очень важный момент — его повышение не является критерием для назначения антимикробной терапии. Результаты собственных исследований показывают, что, уровень СРБ при поступлении в стационар в среднем составил $84,7 \pm 51,1$ мг/л, и наблюдалась корреляционная зависимость с высоким уровнем D-димера [2–4, 12].

Напротив, ПКТ при коронавирусной инфекции с поражением респираторных отделов лёгких, как правило, находятся в пределах референсных значений [13, 14]. Это находит подтверждение в широко известных работах, продемонстрировавших нормальный уровень ПКТ при других вирусных заболеваниях — тяжёлом гриппе А (H1N1), тяжёлом остром респираторном синдроме (ТОРС) и SARS-CoV-2 [15, 16]. Повышение ПКТ у пациентов с COVID-19 свидетельствует о присоединении бактериальной инфекции и коррелирует с тяжестью течения, распространённостью воспалительной инфильтрации и прогнозом при бактериальных осложнениях.

В исследовании G. Zhang с соавт. [17] продемонстрировано, что высокий уровень ПКТ, наряду с такими критериями, как пожилой возраст, хронические сопутствующие заболевания, коинфекции, увеличивал риск неблагоприятных клинических исходов. Повышение уровня ПКТ было отмечено у 32,1% пациентов, при этом концентрации в группах тяжёлого и нетяжёлого течения COVID-19 достоверно различались. В группе пациентов с тяжёлым течением COVID-19 у 92,3% пациентов уровень ПКТ составил > 1 нг/мл. При этом, уровни ПКТ не были повышены у большинства пациентов с COVID-19, что указывает на отсутствие необходимости назначения антибиотиков.

В другом исследовании повышенный уровень ПКТ ассоциировался с повышенным совокупным неблагоприятным исходом, включавшим смертность и тяжёлое течение COVID-19. Показано, что уровень ПКТ $\geq 0,5$ нг/мл имеет диагностическую ценность для прогнозирования неблагоприятного исхода (чувствительность 88% и специфичность 68%) [18].

В метаанализе, включившем 13 исследований и 3027 пациентов с SARS-CoV-2-инфекцией, концентрация ПКТ $> 0,5$ нг/мл достоверно ухудшала прогноз заболевания [19].

Таким образом, принципиально важно при ведении пациента с поражением лёгких при COVID-19 мониторировать как уровень СРБ, так и ПКТ [2–4]. У данных биомаркеров в этой клинической ситуации разные точки приложения: в первом случае (СРБ) — анализ активности системного процесса и решение о назначении противовоспалительной терапии, во втором (ПКТ) — диагностика внутрибольничных бактериальных осложнений, требующих назначения антибиотиков.

Согласно проведённого нами анализа, уровень ПКТ у всех поступивших в стационар с поражением лёгких COVID-19, вне зависимости от объёма поражения лёгочной ткани (от 25 и более 75%) на первоначальном этапе составил менее 0,5 нг/мл. Таким образом, у всех пациентов, поступивших в стационар, отсутствовали объективные критерии для назначения антимикробной терапии [2–4, 12].

Целый ряд клинических исследований продемонстрировали, что вторичная инфекция у больных с COVID-19 развивается в 17,6% [20]. Среднее время до появления вторичных инфекций составляет порядка 17 дней после постановки диагноза COVID-19 в группе не выживших и 14 дней — для группы выживших пациентов, у которых развилась вторичная инфекция. Подчеркивается, что использование комбинированной антибактериальной терапии было значимым предиктором возникновения внутрибольничной инфекции [21]. В метаанализе и систематическом обзоре B. J. Langford с соавт. [22], включающем 24 исследования с участием 3338 пациентов с COVID-19, показано, что бактериальная коинфекция на момент обращения за медицинской помощью была выявлена у 3,5% пациентов, а вторичная бактериальная инфекция осложняла течение COVID-19 у 14,3% пациентов. В целом общая доля пациентов с бактериальными инфекциями составила 6,9%. Бактериальная инфекция чаще встречалась у пациентов в критическом состоянии (8,1%). В более позднем систематическом обзоре авторы оценили уровень бактериальной коинфекции для SARS-CoV-2 между 6,1 и 8,0%, по данным анализа 31 исследования [23].

Несмотря на демонстрируемый общий низкий уровень бактериальных инфекций средняя частота использования антибиотиков, по мнению зарубежных авторов, составляет более 70%. Назначение АБТ было выше в старших возрастных группах, у больных с тяжёлым течением COVID-19 и нуждающихся в ИВЛ [20, 22, 23]. В наших немногочисленных отечественных публикациях подтверждение широкого использования антибиотиков при COVID-19 в реальной клинической практике находит в 70–80% случаев. При этом частота их назначения была выше в группе умерших пациентов и достигала 94%. Рутинное назначение антибактериальных препаратов не показало их положительного влияния на исходы, что вполне логично при вирусной инфекции [24].

Помимо очевидного негативного влияния на рост антибиотикорезистентности, что мы видели и ранее при масштабном нерациональном использовании антимикробных препаратов [10, 25, 26], стоит отметить и крайне высокий риск нежелательных явлений, которые сопутствуют неправильно назначенной антибиотикотерапии. Это и нарушения работы ЖКТ, инфекция *Clostridium difficile* и целый ряд жизнеугрожающих состояний. Так, в собственном наблюдении было показано, что сочетание препаратов азитромицина и гидроксихлорохина через 6 дней лечения гарантированно приводит к достоверному увеличению среднего значения интервала QT, что закономерно увеличивает риск возникновения фатальных осложнений [27].

Сегодня на страницах временных методических рекомендаций, появились чёткие дефиниции для назначения противовирусных препаратов, а именно обозначен амбулаторный период помощи и сроки для начала применения. «Золотое» время для положительного действия противовирусных препаратов — конец инкубационного периода и первые дни заболевания. Оправдано ли назначение антибиотиков в данном периоде времени? Да, безусловно, но при наличии чётких критериев бактериального (сопутствующего) процесса (обострение ХОБЛ, хронического бронхита, гнойного синусита и пр.) при COVID-19. Соответственно, и выбор антибактериальной терапии должен соответствовать таковой при внебольничной инфекции с учётом факторов риска неэффективности терапии при условии развитии бактериальной инфекции вне стационара или в первые 48 ч пребывания в стационаре. Если пациент находится в стационаре более 48 ч, то любые клинические, инструментальные и лабораторные признаки бактериальной инфекции должны трактоваться как нозокомиальные события, и антибактериальная терапия должна назначаться в соответствии с существующими рекомендациями. [1].

Таким образом, назначение антибактериальной терапии у пациентов с COVID-19 оправдано только при наличии убедительных признаков бактериальной инфекции — новое начало лихорадки, появление гнойной мокроты, повышение прокальцитонина крови более 0,25–0,5 нг/мл, лейкоцитоз, в сочетании с появлением новых или прогрессирующих лёгочных инфильтратов, положительный результат микробиологического исследования из образцов нижних дыхательных путей (мокрота, трахеальный аспират, бронхоальвеолярный лаваж).

Применение антибиотиков у пациентов с нозокомиальной пневмонией на фоне течения COVID-19 проводится по общим правилам — с учётом тяжести состояния пациента, преморбидного фона, факторов риска инфекции, вызванной резистентными бактериями, результатов этиологической диагностики и конечно на основании результатов микробиологического исследования. В терапии могут использоваться следующие антибактериальные препараты: азтреонам (в комбинации с цефтазидимом/авибактамом), имипенем/циластатин, линезолид, меропенем, пиперациллин/тазобактам, полимиксин В (только в комбинации), телаванцин, тигециклин, фосфомицин (только в комбинации), цефтазидим/авибактам, цефтолозан/тазобактам, цефепим/сульбактам и др. Данный перечень обусловлен тем, что в подавляющем числе случаев нозокомиальная инфекция вызвана грамотрицательными микроорганизмами, обладающими множественными механизмами резистентности.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. Зайцев А. А. — концепция, написание текста, Макаревич А. М. — концепция, редактирование текста, утверждение финальной версии.

Литература/References

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022). Доступно по: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attachments/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf. Ссылка активна на 10.07.2022. [Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii. Vremennye metodicheskie rekomendatsii. Profilaktika, diagnostika i lechenie novoi koronavirusnoi infektsii (COVID-19). Versiya 15 (22.02.2022). Available from: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attachments/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf. Accessed: July 10, 2022. (in Russian)]
2. Зайцев А.А., Чернов С.А., Крюков Е.В., Голухова Е.З., Рыбка М.М. Практический опыт ведения пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 в стационаре (предварительные итоги и рекомендации). Лечащий врач. 2020; 6: 74–79. [Zaitsev A.A., Chernov S.A., Kryukov E.V., Golukhova E.S., Rybka M.M. Practical experience of managing patients with novel coronavirus infection COVID-19 in hospital (preliminary results and guidelines). Lechashchiy Vrach Journal. 2020; 6: 74–79 (in Russian)]
3. Зайцев А. А. Письмо в редакцию. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (2): 84–86. <https://doi.org/10.36488/cmac.2020.2.84-86>. [Zaitsev A.A. Letter to editors. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2020; 22 (2): 84–86 (in Russian)]
4. Зайцев А.А., Чернов С.А., Стец В.В. и др. Алгоритмы ведения пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 в стационаре. Методические рекомендации. Consilium Medicum. 2020; 22 (11): <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.11.200520>. [Zaitsev A.A., Chernov S.A., Stets V.V. et al. Algorithms for the management of patients with a new coronavirus COVID-19 infection in a hospital. Guidelines. Consilium Medicum. 2020; 22 (11): <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.11.200520>. (in Russian)]
5. Griffin D.O., Brennan-Rieder D., Ngo B. et al. The Importance of Understanding the Stages of COVID-19 in Treatment and Trials. AIDS Rev. 2021 Feb 8; 23 (1): 40–47. doi: 10.24875/AIDSRev.200001261.
6. Li J., Wang J., Yang Y., Cai P., Cao J., Cai X., Zhang Y. Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. Antimicrob Resist Infect Control. 2020 Sep 22; 9 (1): 153. doi: 10.1186/s13756-020-00819-1.
7. Rawson T.M., Moore L.S.P., Zhu N., Ranganathan N., Skolimowska K., Gilchrist M. et al. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. Clin Infect Dis. 2020 Dec 3; 71 (9): 2459–2468. doi: 10.1093/cid/ciaa530.
8. De Waele J.J., Derde L., Bassetti M. Antimicrobial stewardship in ICUs during the COVID-19 pandemic: back to the 90s? Intensive Care Med. 2021 Jan; 47 (1): 104–106. doi: 10.1007/s00134-020-06278-x. Epub 2020 Oct 17.
9. Зайцев А.А., Яковлев С.В., Козлов Р.С., Сидоренко С.В., Белевский А.С., Малахов А.Б. и др. О применении антибактериальной терапии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Терапевтический архив. 2020; 92 (11): 4. [Zaitsev A.A., Yakovlev S.V., Kozlov R.S., Sidorenko S.V., Belevskii A.S., Malakhov A.B. et al. About the use of antibacterial therapy in patients with a new coronavirus infection COVID-19. Therapeutic Archive. 2020; 92 (11): 4 (in Russian)]
10. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. Внебольничная пневмония у взрослых. 2021. Доступно по: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/654_1. Ссылка активна на 12.07.2022. [Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii. Klinicheskiye rekomendatsii. Vnebolnichnaya pnevmoniya u vzroslykh. 2021. Available from: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/654_1. (in Russian)]
11. Зайцев А.А., Овчинников Ю.В., Кондратьева Т.В. Анализ клинико-диагностических возможностей инструментов оценки тяжести и

Conflict of interests. The authors declared about the absence of a conflict of interest, which should be reported.

Contribution. Zaitsev A. A. — concept, writing the text. Makarevich A. M. — concept, text editing, approval of the final version.

- прогноза внебольничной пневмонии у пациентов молодого возраста из организованных коллективов. Пульмонология. 2014; 5: 67–72. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-5-67-72>. [Zaitsev A.A., Ovchinnikov Yu.V., Kondrat'eva T.V. An analysis of diagnostic values of prognostic tools for community-acquired pneumonia in young patients in a closed community. Pulmonologiya. 2014; 5: 67–72. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-5-67-72>. (in Russian)]
12. Зайцев А.А., Голухова Е.З., Мамалыга М.Л., Чернов С.А., Рыбка М.М., Крюков Е.В. и др. Эффективность пульс-терапии метилпреднизолоном у пациентов с COVID-19. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (2): 88–91. <https://doi.org/10.36488/cmac.2020.2.88-91>. [Zaitsev A. A., Golukhova E.Z., Mamalyga M.L., Chernov S.A., Rybka M.M., Kryukov E.V. et al. Efficacy of methylprednisolone pulse therapy in patients with COVID-19. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2020; 22 (2): 88–91. <https://doi.org/10.36488/cmac.2020.2.88-91>. (in Russian)]
 13. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X. et al. China medical treatment expert group for COVID-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. N Engl J Med. 2020 Apr 30; 382 (18): 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032. Epub 2020 Feb 28.
 14. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet. 2020 Feb 15; 395 (10223): 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7. Epub 2020 Jan 30.
 15. Ingram P.R., Inglis T., Moxon D., Speers D. Procalcitonin and C-reactive protein in severe 2009 H1N1 influenza infection. Intensive Care Med. 2010 Mar; 36 (3): 528–32. doi: 10.1007/s00134-009-1746-3.
 16. Cuquemelle E., Souliis E., Villers D., Roche-Campo E., Ara Somohano C., Fartoukh M. et al. A/H1N1 REVA-SRLF Study Group. Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. Intensive Care Med. 2011 May; 37 (5): 796–800. doi: 10.1007/s00134-011-2189-1. Epub 2011 Mar 3.
 17. Zhang G., Hu C., Luo L., Fang F., Chen Y., Li J. et al. Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. J Clin Virol. 2020 Jun; 127: 104364. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104364. Epub 2020 Apr 9.
 18. Huang L., Pranata R., Lim M.A., Oehadian A., Alisjahbana B. C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, and ferritin in severe coronavirus disease-2019: a meta-analysis. Ther Adv Respir Dis. 2020 Jan-Dec; 14: 1753466620937175. doi: 10.1177/1753466620937175.
 19. Zheng Z., Peng F., Xu B., Zhao J., Liu H., Peng J. et al. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. J Infect. 2020 Aug; 81 (2): e16–e25. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.021. Epub 2020 Apr 23.
 20. Chedid M., Waked R., Haddad E., Chetata N., Saliba G., Choucair J. Antibiotics in treatment of COVID-19 complications: a review of frequency, indications, and efficacy. J Infect Public Health. 2021 May; 14 (5): 570–576. doi: 10.1016/j.jiph.2021.02.001. Epub 2021 Feb 9.
 21. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet. 2020 Mar 28; 395 (10229): 1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
 22. Langford B.J., So M., Raybardhan S., Leung V., Westwood D., MacFadden D.R., Soucy J.R., Daneman N. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2020 Dec; 26 (12): 1622–1629. doi: 10.1016/j.cmi.2020.07.016. Epub 2020 Jul 22.
 23. Langford B.J., So M., Raybardhan S., Leung V., Soucy J.R., Westwood D., Daneman N., MacFadden D.R. Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2021 Apr; 27 (4): 520–531. doi: 10.1016/j.cmi.2020.12.018. Epub 2021 Jan 5.
 24. Визель А. А., Абдулганиева Д. И., Баялиева А. Д., Ванюшин А.А., Салахова И.Н., Вафина А.Р. и др. Анализ ведения больных с новой инфекцией COVID-19: опыт первых 5 мес. Практическая пульмонология. 2020; 3: 61–73. [Vizel A.A., Abdulganieva D.I., Bayaliev A.D.,

- Vanyushin A.A., Salakhova I.N., Vafina A.R. et al. The analysis of management of patients with COVID-19: experience of the first 5 months. *Prakticheskaya Pulmonologiya*. 2020; 3: 61–72. (in Russian)]
25. Иванчик Н.В., Чагарян А.Н., Сухорукова М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В., Кречикова О.И. и соавт. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПЕГАС 2014–2017». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21 (3): 230–237. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237>. [Ivanchik N.V., Chagaryan A.N., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S., Dekhnich A.V., Krechikova O.I. et al. Antimicrobial resistance of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia: the results of multicenter epidemiological study «ПЕГАС 2014–2017». *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; 21 (3): 230–237. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237>. (in Russian)]
 26. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Романов А.В., Зайцев А.А., Раковская И.В., Бархатова О.И. и др. Четыре случая выявления мутаций устойчивости в гене 23s PPHK *Mycoplasma pneumoniae*, выделенных от военнослужащих с пневмонией, находящихся на лечении в военном госпитале. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19 (3): 248–253. [Edelstein I.A., Edelstein M.V., Romanov A.V., Zaitsev A.A., Rakovskaya I.V. et al. Four cases of resistance mutations in 23S rRNA gene in *Mycoplasma pneumoniae* isolated from the hospitalized military personnel. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2017; 19 (3): 248–253. (in Russian)]
 27. Орлов Ф.А., Зайцев А.А., Кубенский Г.Е., Пантюхова Т.Н. Оценка длительности интервала QT у пациентов с COVID-19 на фоне лечения гидроксихлорохином и азитромицином. *Consilium Medicum*. 2020; 22 (12): 15–19. <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.12.200540>. [Orlov F.A., Zaitsev A.A., Kubenskii G.E., Pantiukhova T.N. Assessment of the duration of QT interval in patients with COVID-19 during treatment with hydroxychloroquine and azithromycin. *Consilium Medicum*. 2020; 22 (12): 15–19. <https://doi.org/10.26442/20751753.2020.12.200540>. (in Russian)]

Информация об авторах

Зайцев Андрей Алексеевич — д. м. н., профессор, заслуженный врач РФ, главный пульмонолог, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь им. академика Н. Н. Бурденко» МО РФ; зав. кафедрой пульмонологии (с курсом аллергологии) Медицинского института непрерывного образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0934-7313. SPIN-код: 6549-5154

Макаревич Андрей Михайлович — к. м. н., заслуженный врач РФ, заместитель начальника госпиталя (по клинико-экспертной работе), врач-пульмонолог, Федеральное государственное казенное учреждение «301 военный клинический госпиталь» МО РФ, Хабаровск, Россия

About the authors

Andrey A. Zaitsev — D. Sc. in Medicine, Professor, Distinguished physician of the Russian Federation, Chief Pulmonologist at the Main Military Clinical Hospital named after academician N.N. Burdenko of the Ministry of Defense of the Russian Federation; Head of the Department of Pulmonology (with a course in Allergology) at the Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0934-7313. SPIN: 6549-5154

Andrey M. Makarevich — Ph. D. in Medicine, Distinguished physician of the Russian Federation, Pulmonologist, Deputy Head (for clinical and expert work) at the 301st Military Clinical Hospital of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Khabarovsk, Russia

Современное состояние проблемы капсульного типирования *Streptococcus pneumoniae*

*Ю. А. ЗАХАРОВА¹, В. Г. АКИМКИН², Е. В. НИКИТИНА³,
И. А. ИВАЩЕНКО¹, Е. В. БОЛГАРОВА¹, Е. В. АЛЕКСАНДРОВА⁴,
С. М. СКРИПКОВСКАЯ³

¹ Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

² ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

Current State of the *Streptococcus pneumoniae* Capsular Typing Problem

*YULIYA A. ZAKHAROVA¹, VASILY G. AKIMKIN², EKATERINA V. NIKITINA³,
IVAN A. IVASHCHENKO¹, EKATERINA V. BOLGAROVA¹, EKATERINA V. ALEKSANDROVA⁴,
SVETLANA M. SKRIPKOVSKAYA³

¹ Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russia

² Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia

³ Children's Scientific Clinical Center of Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Болезни, вызываемые *Streptococcus pneumoniae*, для систем здравоохранения всех ведущих стран мира являются серьёзной медико-социальной проблемой. В связи с этим возрастает актуальность их лабораторной диагностики, от этого зависит эффективность лечебных, профилактических и противоэпидемических мероприятий. В настоящее время отсутствует универсальный способ внутривидовой идентификации *S. pneumoniae*, обладающий одновременно высокой специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью. В этой связи разрабатываются новые стратегии, направленные на повышение качества исследований. В обзоре представлены данные отечественных и зарубежных научных публикаций (поисковые электронные базы eLibrary.ru, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Springerlink) о проведении серотипирования и генотипирования *S. pneumoniae*, проанализированы их преимущества и недостатки. Выявлены эпидемически значимые серотипы и распространённые клональные комплексы *S. pneumoniae*, циркулирующие на территории Российской Федерации. Признана необходимость совершенствования новых методов внутривидового типирования возбудителя.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*; серотипы; ПЦР; мультилокусное секвенирование-типирование; внутривидовая идентификация

Для цитирования: Захарова Ю. А., Акимкин В. Г., Никитина Е. В., Иващенко И. А., Болгарова Е. В., Александрова Е. В., Скрипковская С. М. Современное состояние проблемы капсульного типирования *Streptococcus pneumoniae*. Антибиотики и химиотер. 2022; 67: 9–10: 69–78. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-69-78>.

Abstract

Diseases caused by *Streptococcus pneumoniae* are a serious medical and social problem for healthcare systems of all leading countries around the globe. In this regard, the relevance of their laboratory diagnostics increases, as the effectiveness of therapeutic, preventive, and anti-epidemic measures depends on it. Currently, there is no universal method of intraspecific identification of *S. pneumoniae*, which simultaneously possess high specificity, sensitivity, and reproducibility. For this purpose, new alternative strategies aimed at improving the quality of research are being developed. The review presents data from domestic and foreign publications (electronic search databases eLibrary.Ru, ScienceDirect, Scopus, PubMed, Springerlink) on serotyping and genotyping of *S. pneumoniae*; the advantages and disadvantages of the methods are analyzed. Epidemiologically significant serotypes and widespread clonal complexes of *S. pneumoniae* circulating on the territory of the Russian Federation have been identified. The necessity of improving new methods of intraspecific typing of the pathogen is recognized.

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул. Летняя, д. 23, Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций, г. Екатеринбург, Россия, 620030. E-mail: zakharova_ya@eniivi.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 23 Letnyaya st., Yekaterinburg, Russia, 620030. E-mail: zakharova_ya@eniivi.ru

Введение

Инфекции, вызываемые *Streptococcus pneumoniae*, являются актуальной медицинской проблемой во многих регионах мира. Пневмококковая пневмония — ведущая причина заболеваемости и смертности населения от воспалительных заболеваний нижних отделов дыхательных путей [1]. Только в России ежегодно число случаев пневмоний превышает 600 тыс. Особую значимость пневмококковая инфекция представляет для детей в возрасте до 5 лет, пожилых лиц старше 65 лет и для пациентов с хроническими заболеваниями органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, функциональной или анатомической аспленией, сахарным диабетом, иммунодефицитами и др. [2–5]. В связи с этим снижение заболеваемости и смертности от пневмококковой инфекции является важной социально-экономической задачей [6]. Одна из серьёзных проблем в борьбе с пневмококковой инфекцией состоит в сложности выделения, идентификации и типирования возбудителя.

Практическая важность типирования пневмококков резко возросла после начала массовой иммунизации различных групп населения полисахаридными и конъюгированными вакцинами, протективное действие которых основано на индукции бактерицидных антител к капсульным полисахаридам микроорганизма. В конъюгированных вакцинах полисахариды связаны с белками-носителями, что существенно повышает их иммуногенность. На сегодняшний день известно более 100 антигенных вариантов капсульных полисахаридов (серотипов) [7–9], очевидно, что создать вакцину, включающую все известные полисахариды, крайне сложно. Доступные полисахаридные вакцины включают 23 серотипа, а конъюгированные — до 20, разрабатываются вакцины ещё большей валентности. В вакцины включают полисахариды серотипов, играющих основную роль в патологии человека. Некоторые из них характеризуются выраженными вирулентными свойствами и ассоциируются с определёнными клиническими формами. Так, серотипы 3 и 14, чаще вызывают пневмонии и плевриты с деструкцией лёгочной ткани [10, 11], серотипы 3 и 19F — острый средний отит у детей. Фактором, существенно осложняющим формирование и реализацию программ антипневмококковой вакцинации, является вариабельность серотипового состава популяций пнев-

мококков, циркулирующих в отдельных географических регионах. Более того, серотиповой состав пневмококковых популяций меняется в ответ на вакцинацию населения, в силу различных механизмов происходит вытеснение из циркуляции «вакцинных» серотипов и распространение «невакцинных». Приведённые факты однозначно доказывают необходимость проведения постоянного наблюдения за серотиповым составом популяций пневмококков, циркулирующих на всей территории Российской Федерации и критическую важность наличия эффективных, надёжных и доступных методов определения их серотиповой принадлежности.

История серотипирования пневмококка

Streptococcus pneumoniae, пневмококк, был открыт независимо Л. Пастером и Д. М. Штернбергом в 1881 г., и вскоре после этого был признан основным возбудителем пневмонии. Для лечения пациентов с пневмококковой пневмонией была предложена иммунная сыворотка. Исследования сывороток пациентов в фазе выздоровления показали серологическую гетерогенность пневмококков. Дополнительные исследования, проведённые в начале XX в., выявили большое количество серологических групп и установили, что иммунная защита против пневмококка в первую очередь зависит от серотипа возбудителя [12].

Серотип-специфичные антисыворотки широко использовались для лечения пациентов в начале XX в., однако были доступны не для всех серотипов, по этой причине — не всегда эффективны, иллюстрацией чему явилась смерть датского принца Вальдемара в 1939 г. У него была обнаружена пневмококковая пневмония, вызванная микроорганизмом серогруппы 9, но пациент не реагировал на лечение антисыворотками 9L и 9N. Дополнительные исследования после его смерти показали, что пневмония была вызвана новым серотипом в серогруппе 9, который затем был назван 9V в его честь [13]. Случай принца Вальдемара свидетельствовал о необходимости точного дифференцирования пневмококков внутри серогруппы. Для повышения эффективности терапии антисыворотками были разработаны процедуры серотипирования, общепринятым стал метод, основанный на реакции набухания капсулы (Quellung reaction), предложенный в 1902 г. немецким микробиологом и иммунологом Ф. Нейфельдом, и до

сих пор остающийся «золотым стандартом» серотипирования пневмококка.

Исследования в Дании привели к созданию системы классификации серотипов пневмококка, серотип был определён как штаммы пневмококка, продуцирующие капсульный полисахарид с уникальными химической структурой и серологическими (иммунологическими) свойствами. Серогруппа была определена как включающая серотипы, которые имеют много общих серологических свойств (например, перекрёстнореактивные антитела) [12].

Появление антибиотиков и высокая чувствительность пневмококков к пенициллину сняли актуальность серотипирования пневмококков. Однако с развитием вакцинации и вызванным ею эффектом замены серотипов, а также с увеличением числа антибиотикорезистентных штаммов, серотипирование пневмококков вернулось на передний план клинического интереса. До тех пор, пока пневмококковые вакцины основаны на капсульных полисахаридах, будет существовать потребность в методах определения типов капсул пневмококка [12].

Серологические методы

Метод Нейфельда основан на том, что при добавлении к взвеси бактерий сыворотки, содержащей антитела против капсульных полисахаридов данного серотипа пневмококка, происходит резкое увеличение (набухание) капсулы, которое хорошо видно под микроскопом. При разработке новых методов типирования стандартизацию проводят с использованием именно этой реакции [10, 14]. К основным недостаткам метода относят его трудоёмкость и дороговизну антисывороток, выпускаемых Датским институтом сывороток (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Метод Нейфельда был значительно упрощён путём разработки 12 пуловых сывороток, специфические свойства которых перекрываются в шахматном порядке, что позволяет идентифицировать серотип неизвестного изолята, используя всего 12 реагентов [15]. Однако этот метод оставался медленным и трудоёмким, и продолжался поиск новых подходов, из которых весьма успешным оказался метод латекс-агглютинации с использованием латексных частиц, покрытых кроличьей антикапсулярной антисывороткой [16, 17]. Очень удачная версия метода латекс-агглютинации была разработана путём покрытия одного типа латексных частиц пулированной кроличьей антисывороткой, распознающей несколько серотипов/серогрупп, и придания специфичности каждому типу частиц в шахматном порядке. Этот тест, называемый Pneumotest-Latex, является быстрым и простым в использовании [18].

В 2003 г. М. А. Mudany и соавт. [19] оценили эффективность нового набора типирования Denka для 285 штаммов *S. pneumoniae*. Набор состоит из 8 пуловых сывороток, 40 групповых сывороток, 41 специфической сыворотки. Для данного набора проводится реакция агглютинации на предметном стекле. Метод показал себя быстрым (5 мин вместо 15 мин реакции Нейфельда), дешёвым, простым в исполнении, не требующим дополнительного оборудования. Он характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью. К некоторым ограничениям можно отнести сложность определения серотипов у дефектных штаммов, необходимость выделения чистой культуры. Возможно получение ложного отрицательного результата при слабой экспрессии капсулы или её утрате. Кроме того, три диагностические сыворотки в наборе не обладают типоспецифичностью вследствие гетерогенных перекрестных реакций, что может привести к неверной идентификации серотипа [18]. В ряде исследований [20–22] была показана возможность применения метода латекс-агглютинации для серотипирования пневмококка непосредственно в клинических образцах из стерильных в норме локусов (кровь, ликвор).

В 2010 г. С. L. Sheppard и соавт. [22] предложили метод определения серотип-специфичных антигенов в моче, позволяющий детектировать 15 серотипов *S. pneumoniae* (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F), входящих в ПКВ-15 (Merck). Метод (SSUAD — ST-specific urine antigen detection) основан на использовании серотип-специфичных моноклональных антител с применением микрофлюидной системы Lumineх, при этом применяются магнитные шарики Lumineх, что позволяет автоматизировать этапы промывки и повысить пропускную способность анализа. В своей работе авторы продемонстрировали, что метод является точным, высокочувствительным и специфичным и пригоден для выявления серотип-специфичных полисахаридов пневмококка в моче взрослых в ходе проведения эпидемиологических исследований и клинических испытаний. Применение метода лимитировано ограниченным набором серотипов, которые можно определять с его помощью.

W. V. Kalina и соавт. [23] расширили спектр серотипов, определяемых с помощью моноклональных антител в моче, разработав тест (UAD2) для идентификации 11 дополнительных серотипов пневмококка, 7 из которых входят в вакцину PCV20 (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F), а 4 являются невакцинными (2, 9N, 17F и 20). R. Isturiz и соавт. [24] при помощи указанной методики изучили распределение серотипов пневмококка у взрослых в возрасте старше 18 лет, госпитали-

зированных с рентгенологически подтвержденной внебольничной пневмонией в США, и выявили значительную долю пациентов, у которых были обнаружены серотипы, входящие только в PCV 20. К аналогичному выводу пришли исследователи, изучавшие распределение серотипов *S.pneumoniae* при помощи тестов UAD1 (на серотипы PCV13)/UAD2 у пациентов с внебольничной пневмонией в Испании [25].

Следует отметить, что данный метод исследования применяется для взрослых пациентов, притом, что основной группой риска развития пневмококковой инфекции являются дети младшего возраста.

Генотипические методы

Типирование на основе ПЦР. При выполнении научно-исследовательских работ широкое применение нашёл метод типирования *S.pneumoniae* на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Способ позволяет идентифицировать капсульные серотипы *S.pneumoniae* не только в «чистой» культуре, но и в исходном биологическом материале. Метод основан на идентификации последовательностей *cps*-локусов, в которых локализованы гены *S.pneumoniae*, ответственные за синтез капсульных полисахаридов. Их синтез может осуществляться Wzy-зависимым или synthase-зависимым путём. Последний характерен только для 3-го и 37-го серотипов. Генетические отличия между *cps*-локусами различных серогрупп и серотипов *S.pneumoniae* детально изложены в работе S. D. Bentley и соавт. [26]. При ПЦР-типировании проводится детекция генов-мишеней *S.pneumoniae*, например, *wzy*, *wzx*, *galU*, *wciP*, *wciN*, *wciW* [27]. В работе R. Pai и соавт. [28] авторы представили схему типирования *S.pneumoniae* на основе мультиплексной ПЦР, где стоимость одного исследования составляла от 2 до 5 долларов (для сравнения при типировании антисыворотками — 28 долларов). Капсульное ПЦР-типирование осуществляют в несколько этапов, их выполняют последовательно. Вначале проводят скрининг исследуемых образцов на присутствие ДНК пневмококка, мишенью является ген *lytA*, кодирующий аутолизин.

На проблеме обнаружения ДНК пневмококка методом ПЦР стоит остановиться более подробно. Протокол детекции *S.pneumoniae* по гену *lytA* рекомендован Centers for Disease Control and Prevention [29] (обновлен в июне 2021 г.) на основе работы M. da G. Carvalho и соавт. [30]. В обзоре A. J. Blaschke [31] автор делает вывод, что аутолизин специфичен для *S.pneumoniae*, и использование этой мишени может решить проблемы неправильной идентификации. Тем не менее, были предложены и другие мишени для ПЦР-обнару-

жения пневмококка. Н. К. Park и соавт. [32] с этой целью использовали специфичный для *S.pneumoniae* ген, кодирующий биосинтез капсульных полисахаридов (*cpsA*), и показали, что данный ген позволяет проводить определение *S.pneumoniae* с высокими показателями чувствительности и специфичности. Однако E. Sadowy и соавт. [33] отметили, что аллели *cpsA* пневмококковых серотипов 25A, 25F и 38 слишком отличаются от типичных пневмококковых генов *cpsA*, чтобы дать положительные результаты в этой ПЦР, и такие проблемы могут возникнуть в случае некоторых новых серотипов. К тому же функциональные локусы *cps*, включая консервативные гены *cpsABCD*, наблюдались у ряда видов стрептококков *Mitis*, что указывает на низкую полезность мишени *cpsA* для различения *S.pneumoniae* и других представителей группы *Mitis*.

A. L. S. Lang и соавт. [34] предложили использовать две специфичные для пневмококка ПЦР-мишени (*lytA* и *cpsA*) для уменьшения вероятности ложноположительных результатов. Также для детекции ДНК пневмококка успешно использовали SP2020 — предположительно, ген-регулятор транскрипции [35]. В работах последних лет, посвящённых данной проблеме [36, 37], высказывается предположение, что использование комбинации нескольких выбранных мишеней значительно повышает вероятность правильной идентификации пневмококка с помощью ПЦР. Полногеномные исследования на современном этапе значительно улучшили наше понимание взаимоотношений внутри группы стрептококков *Mitis*, и они также помогут лучше определить мишени для быстрого, экономичного и специфичного выявления *S.pneumoniae* и других стрептококков *Mitis* [36].

Образцы, в которых выявлена ДНК пневмококка, тестируют в мультиплексных ПЦР с праймерами, охватывающими наиболее часто встречаемые серотипы и серогруппы *S.pneumoniae* (как правило, используемые в вакцинах). При этом учитывают возможность комбинировать праймеры в одном мультиплексе [28, 27]. При проведении типирования *S.pneumoniae* в РФ на начальном этапе выделения ДНК обычно применяют наборы «АмплиСенс ДНК-сорб Б» (ИнтерЛабСервис, Россия), «QIAamp DNA Mini Kit» (QiaGen, Нидерланды), для последующих этапов — реагенты производства «Евроген» (Россия), «Синтол» (Россия).

На ресурсе Centers for Disease Control and Prevention [9] приведены нуклеотидные последовательности специфических праймеров и методики определения сорока одного серотипа *S.pneumoniae* (преимущественного циркулирующих в США, Латинской и Южной Америке, Африке и Азии) с использованием мультиплексной ПЦР. Отмеча-

ется, что неточный результат чаще определяют при типировании 25-го и 38-го серотипов, в некоторых случаях 14-го и 35А. Указанные методики рассчитаны на использование электрофоретического разделения продуктов амплификации в агарозном геле. Там же представлены схемы постановки семи триплексных ПЦР в режиме Real Time, которые отличаются меньшим количеством этапов. Также на сайте Centers for Disease Control and Prevention [9] со ссылкой на статью S. Velusamy и соавт. [38] дана методика типирования 64 серотипов *S. pneumoniae*. Авторы разработали схему последовательных квадриплексных Real Time ПЦР, позволяющую идентифицировать серотипы внутри серогруппы 6, 22 и 7. Крупные гомологичные группы ими были разделены на более мелкие. Так, группа 12F/12A/12B/44/46 была разделена на подгруппы 12F/44 и 12A/12B/46, а группа 33A/33F/37 — на 33A/33F и 37. Указано, что использование ПЦР для исследования биоматериала, полученного от носителей *S. pneumoniae*, может привести к получению сомнительных результатов. Так, обнаружена возможность амплификации некоторых специфических для *S. pneumoniae* мишеней при серотипировании *S. mitis*, *S. oralis*, *S. parasanguis* и *S. gordonii* [39].

В исследовании M. Antonio и соавт. [40] приводятся данные об эффективности методов ПЦР и латекс-агглютинации. Проанализировано 279 изолятов, установлено, что при использовании метода латекс-агглютинации идентифицировать серотипы удалось в 218 случаях, при использовании ПЦР — в 184, комплексное исследование выявило 249 положительных результатов. Авторы пришли к выводу, что оба метода целесообразно рассматривать как взаимодополняющие. Отмечено, что эффективность метода ПЦР коррелирует с нагрузкой бактериальной культуры в образце.

Е. В. Никитина и соавт. в работе 2021 г. [41] отмечали снижение эффективности метода капсульного ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae* за 5 лет со 100% в 2016 г. до 41,6% в 2021 г. Авторы пришли к выводу о необходимости совершенствования протокола исследования и предложили для повышения эффективности начинать типирование с наиболее распространенных вариантов, циркулирующих на изучаемой территории. Так, серотипы 2, 5 предполагается исключить из протокола в связи с практически полным их исчезновением из циркуляции на территории РФ, а серотипы 10А, 15BC, 28АF, 31 — напротив, включить в протокол.

Если снижение частоты встречаемости серотипов, входящих в используемый протокол капсульного ПЦР-типирования, можно установить при его непосредственном применении, то для выявления серотипов, которые не охвачены про-

токолом и стали встречаться чаще, необходимо использовать другие методы. Авторы применяли метод капсульного сиквенс-типирования, о котором будет сказано ниже.

Таким образом, к преимуществам метода ПЦР-типирования можно отнести относительную дешевизну, возможность проведения реакции непосредственно из биологического материала (без выделения чистой культуры), сопоставимость с результатами латекс-агглютинации. К недостаткам — меньший охват серотипов (относительно Quellung reaction и латекс-агглютинации), необходимость специального оборудования [39].

В связи с широким внедрением вакцинации от пневмококковой инфекции и сменой циркулирующих серотипов серьёзного рассмотрения требует проблема снижения эффективности представленных выше методов типирования и разработка новых.

Капсульное сиквенс-типирование. В основе метода лежит секвенирование фрагмента генома методом Сэнгера. Типирование *S. pneumoniae* по нуклеотидной последовательности капсульного гена *cpsB* было предложено М. Н. Leung и соавт. [42]. Метод применим к изолятам пневмококка и позволяет из 91 референсного штамма (коллекция SSI) 59 определить с точностью до серотипа и 32 — до гомологичных групп.

В 2017 г. метод был усовершенствован G. Nagaraj и соавт. [43] и получил название «PCRSeqTyping». При реализации способа авторы предлагают известные 91 серотип *S. pneumoniae* разделить на две группы: 59 — «негомологичных» и 32 — «гомологичных». Группу «гомологичных» серотипов предлагают разделить на 10 подгрупп. Серотипы определяют с использованием второго раунда ПЦР с групповыми и индивидуальными специфическими праймерами и последующим секвенированием полученных ампликонов. Данные нуклеотидных последовательностей анализируют в базе данных GenBank. Авторы способа «PCRSeqTyping» доказывают его высокую эффективность на примере безошибочного определения серотипов у 91 эталонного штамма и 28 клинических изолятов. Способ является технологичным, надёжным, экономичным и гибким, поскольку позволяет включать в ход исследований дополнительные праймеры при определении новых серотипов.

MLST. Важным в изучении эволюции и распространения актуальных штаммов *S. pneumoniae* является метод мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), который основан на секвенировании нуклеотидных последовательностей локусов «домашнего хозяйства», не кодирующих факторы вирулентности и патогенности *S. pneumoniae*, но отвечающих за метаболизм микроорганизма. Для реализации метода выбраны 7 аллелей генов «до-

машинного хозяйства» (*aroE*, *ddl*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi* и *xpt*), их комбинация определяет сиквенс-тип *S. pneumoniae* с присвоением уникального номера и позволяет выявить связи между типизируемыми изолятами на отдельных территориях [44]. Данные о последовательностях накапливаются в единой базе данных PubMLST, доступной в сети Интернет. В базе обозначены специфические праймеры и описана методика ПЦР-амплификации. Альтернативные праймеры для определения генов *aroE*, *ddl*, *recA*, *spi* и *xpt* находятся на сайте Centers for Disease Control and Prevention. В линейке нуклеотидных последовательностей они расположены на 40 оснований выше последовательностей, изучаемых при стандартном MLST-типировании. В работе используют наборы «ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit» («Applied Biosystems», США). Для интерпретации результатов применяют специальные электронные компьютерные программы, в их числе «START 0.9.0», «START2», «goeBURST 1.2.1», «EditSeq 4.03», «SeqMan II 4.03». К недостаткам метода относят высокую экономическую составляющую [44, 45]. Применение метода MLST даёт возможность выявить отдельные клональные линии *S. pneumoniae* и оценить их эпидемиологическую значимость [46–49]. Метод применяют с целью своевременной идентификации как известных, так и вновь выявляемых генетических вариантов *S. pneumoniae*. Результаты MLST в совокупности с эпидемиологическими характеристиками (год, место, источник выделения) могут быть использованы для объединения и сопоставления данных, полученных в географическом масштабе. Следует учитывать, что сиквенс-типы *S. pneumoniae* могут обладать различными серотипами (фенотипической вариабельностью), что обусловлено процессами эволюции возбудителя, происходящими в его многочисленной популяции [50–53]. Так, на фоне активной иммунизации ПКВ-13 (пневмококковой конъюгированной 13-валентной вакциной) R. Kaug и соавт. [54] отмечают существенное снижение распространения штаммов серотипа 19A с одновременным увеличением встречаемости серотипов 35B, 23B, 21 и 15ABC. При этом доля штаммов генетического профиля ST199, который ассоциировался с серотипом 19A, оставалась неизменной.

В исследовании К. О. Миронова и др., 2018–2020 гг. [46, 55], проведённом на территории РФ при инвазивных и неинвазивных формах пневмококковой инфекции, отмечено формирование штаммов серотипа 3 единой клональной линии ccST505, включающей сиквенс-типы ST-180, ST-505 и ST-2049, ST-15250, ST15251 с центральным сиквенс-типом ST505. Большая часть штаммов принадлежала к сиквенс-типам ST-180 и ST-505. Примечательно, что штаммы, выделенные при инва-

зивных формах пневмококковой инфекции, имели сиквенс-тип ST-180, при неинвазивных формах — ST-505.

В работе Т. А. Савиновой и др. [48] установлена высокая корреляция между клональным комплексом CC81 (со сниженной чувствительностью к пенициллину) и серотипом 23F. При этом все штаммы 23F соответствовали ST81. В свою очередь, описаны случаи переключения CC81 на серотипы 14, 19A и 19F [56]. Продемонстрирована связь между клональным комплексом CC271 (с сиквенс-типами ST236, ST271, ST651) и серотипом 19F.

В исследовании И. А. Цветковой и др. [57], посвящённом изучению генетической структуры *S. pneumoniae* на территории РФ, отмечено, что одними из распространённых клональных комплексов являются CC81, CC505, CC180 и клональный кластер SC2. Последний был сопоставим с референсным клоном Taiwan19F-14 (ST236), а также с сиквенс-типами ST271 и ST320. Данный кластер преимущественно соответствовал серотипам 19F и 19A. Отмечено распространение кластера SC4, ассоциированного с ST81 и серотипом 23F. Связь между серотипом 19F и сиквенс-типом ST236 выявлена в исследовании Г. В. Белошицкого и др. [58]. Таким образом, в современных литературных источниках [46, 48, 55, 57, 58] авторы прослеживают определённую зависимость между рядом актуальных серотипов и сиквенс-типов *S. pneumoniae*. К ним относят часто встречаемые на территории РФ серотипы 3, 6B, 14, 19F, 23F [2, 46, 55, 59–63] и клональные комплексы CC81, CC236, CC505, CC180, CC315, CC239, CC663, CC230, CC143, CC1025, CC2296 [57].

Полногеномное секвенирование. В настоящее время в лабораторную практику входит метод полногеномного секвенирования, который предоставляет исчерпывающую информацию не только о специфическом *cps*-локусе *S. pneumoniae*, но и о других локусах его «основного» генома. В ряде работ, посвящённых использованию данного метода, авторы безошибочно идентифицировали серотипы всех (100%) исследуемых образцов [15, 59, 64]. К недостаткам метода относили его высокую стоимость и необходимость приобретения высокотехнологичного оборудования [46, 55].

Заключение

Таким образом, разработка и внедрение лабораторных стратегий, направленных на повышение качества внутривидового типирования *S. pneumoniae*, актуального бактериального патогена, являются приоритетом в решении молекулярно-биологических и эпидемиологических задач на современном этапе борьбы с пневмококковой инфекцией, поскольку несут в себе значимый потенциал в изучении новых факторов ви-

рулентности, патогенности и антибиотикорезистентности возбудителя. С решением данной проблемы становится возможным более глубокая оценка филогенетических связей внутри циркулирующей микробной популяции и, как следствие, грамотное обоснование противоэпидемических и профилактических мероприятий, включая вакцинопрофилактику. Особую актуальность представляет поиск и анализ корреляционных связей

между серотиповым и сиквенс-типовым пейзажем *S.pneumoniae*.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-25-20129.

Литература/References

- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborator. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and etiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18: 1191–1210. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4.
- Голоднова С.О., Фельдблюм И.В., Семериков В.В., Николенко В.В., Захарова Ю.А. Распространённость носительства *Streptococcus pneumoniae* среди медицинских работников и оценка эффективности вакцинопрофилактики. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 1 (74): 50–54. [Golodnova S.O., Feldblum I.V., Semerikov V.V., Nikolenko V.V., Zakharova Yu.A. The Prevalence of Carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Medical Specialists and Evaluation of their Vaccination. *Iepidemiologiya i Vakcinoprofilaktika*. 2014; 1 (74): 50–54. (in Russian)]
- Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция: современный взгляд на проблему и профилактику. Вопросы современной педиатрии. 2007; 6 (1): 85–90. [Tatochenko V.K. Pneumococcal infection: modern view on the issue and prevention. *Current Pediatrics*. 2007; 6 (1): 85–90. (in Russian)]
- Брико Н.И., Цапкова Н.Н., Батыршина Л.Р., Коришунов В.А., Фельдблюм И.В., Бикмиева А.В., Субботина К.А., Филиппов О.В. Проблемы вакцинопрофилактики взрослого населения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17 (2): 4–15. <https://doi.org/10.24411-2073-3046-2018-10001>. [Briko N.I., Tsapkova N.N., Batyrsina L.R., Korshunov V.A., Feldblyum I.V., Bikmieva A.V. et al. Problems of vaccinal prevention in adult population. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018; 17 (2): 4–15. <https://doi.org/10.24411-2073-3046-2018-10001>. (in Russian)]
- Adegbola R.A., DeAntonio R., Hill P.C., Roca A., Usuf E., Hoet B. et al. (2014) Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2014; 9 (8): e103293. doi: 10.1371/journal.pone.0103293.
- Баранов А., Намазова Л., Таточенко В. Пневмококковая инфекция и связанные с ней заболевания — серьезная проблема современного здравоохранения. *Педиатрическая фармакология*. 2008; 5 (1): 7–12. [Baranov A., Namazova L., Tatochenko V. Pneumococcal infection and associated diseases — a serious problem of modern health care. *Pediatric Pharmacology*. 2008; 5 (1): 7–12. (in Russian)]
- Pimenta F, Moiane B., Gertz R.E., Chochua S., Snippes Vagnone P.M., Lynfield R. et al. New pneumococcal serotype 15D. *J Clin Microbiol*. 2021; 59: e00329-21. doi: 10.1128/JCM.00329-21.
- Ganaie F, Saad J.S., McGee L., van Tonder A.J., Bentley S.D., Lo S.W. et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large cps fragment from an oral streptococcus. *mBio*. 2020; 11: e00937-20. doi: 10.1128/mBio.00937-20.
- Centres for disease Control and prevention. Pneumococcal disease. For Laboratorians. Available at: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/laboratorians.html> Accessed June 2022.
- Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Катосова Л.К. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 7–8: 38–45. [Mayanskiy N.A., Alyabieva N.M., Lazareva A.V., Katosova L.K. Serotype Diversity and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2014; 7–8: 38–45. (in Russian)]
- Reinert R.R., Paradiso P., Fritzell B. Advances in pneumococcal vaccines: The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Expert Rev Vaccines*. 2010; 9: 229–36. doi: 10.1586/ERV.10.6.
- Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C., Konradsen H.B., Nahm M.H. 17 June 2015. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev*. doi: 10.1128/CMR.00024-15.
- Vammen B. Serological variants of pneumococcus types 9 and 10. *J Immunol*. 1939; 37: 359–365.
- Sorensen U.B. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol*. 1993 Aug; 31 (8): 2097–100. doi: 10.1128/jcm.31.8.2097-2100.1993. PMID: 8370735; PMCID: PMC265703.
- Lafong A.C., Crothers E. Simple latex agglutination method for typing pneumococci. *J Clin Pathol*. 1988; 41: 230–231. doi: 10.1136/jcp.41.2.230.
- Skovsted I.C. Textbook in diagnosis, serotyping, virulence factors and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for measuring pneumococcal antibodies. In: typing of *Streptococcus pneumoniae*. 4th Ed. SSI Diagnostica A/S. 2017; 47.
- Konradsen H.B. Validation of serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *Vaccine*. 2005; 23: 1368–1373. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.09.011.
- Porter B.D., Ortika B.D., Satzke C. Capsular Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by Latex Agglutination. *J Vis Exp*. 2014; 91: e51747. doi: 10.3791/51747.
- Mudany M.A., Kikuchi K., Totsuka K., Uchiyama T. Evaluation of a new serotyping kit for *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2003; 52 (11): 975–980. doi: 10.1099/jmm.0.05306-0.
- Singhal A., Lalitha M.K., John T.J., Thomas K., Raghupathy P., Jacob S., Steinhoff M.C. Modified latex agglutination test for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluid and direct serotyping of *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996 Jun; 15 (6): 472–477. doi: 10.1007/BF01691314. PMID: 8839641.
- Sanz J.C., Culebras E., Rios E., Rodríguez-Avil I., Wilhelmi I., Ramos B., Ordobás M., Picazo J.J. Direct serogrouping of *Streptococcus pneumoniae* strains in clinical samples by use of a latex agglutination test. *J Clin Microbiol*. 2010 Feb; 48 (2): 593–595. doi: 10.1128/JCM.01651-09. Epub 2009 Dec 9. PMID: 20007395; PMCID: PMC2815603.
- Sheppard C.L., Harrison T.G., Smith M.D., George R.C. Development of a sensitive, multiplexed immunoassay using xMAP beads for detection of serotype-specific *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples. *J Med Microbiol*. 2011 Jan; 60 (Pt 1): 49–55. doi: 10.1099/jmm.0.023150-0. Epub 2010 Sep 23. PMID: 20864547.
- Kalina W.V., Souza V., Wu K. et al. Qualification and clinical validation of an immunodiagnostic assay for detecting 11 additional *Streptococcus pneumoniae* serotype-specific polysaccharides in human urine. *Clin Infect Dis*. 2020; 71: e430–8.
- Isturiz R., Grant L., Gray S., Alexander-Parrish R., Jiang Q., Jodar L., Peyrani P., Ford K.D., Pride M.W., Self W.H., Counselman E., Volturo G., Ostrosky-Zeichner L., Wunderink R.G., Sherwin R., Overcash J.S., File T., Ramirez J. Expanded analysis of 20 pneumococcal serotypes associated with radiographically confirmed community-acquired pneumonia in hospitalized US adults. *Clin Infect Dis*. 2021 Oct 5; 73 (7): 1216–1222. doi: 10.1093/cid/ciab375. PMID: 33982098; PMCID: PMC8492118.
- Torres A., Menéndez R., España P.P., Fernández-Villar J.A., Marimón J.M., Cilloniz C., Méndez R., Egurrola M., Botana-Rial M., Ercibengoa

- M., Méndez C., Cifuentes I., Gessner B.D.; CAPA Study Group. The evolution and distribution of pneumococcal serotypes in adults hospitalized with community-acquired pneumonia in Spain using a serotype-specific urinary antigen detection test: the CAPA study, 2011–2018. *Clin Infect Dis*. 2021 Sep 15; 73 (6): 1075–1085. doi: 10.1093/cid/ciab307. PMID: 33851220; PMCID: PMC8442776.
26. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitz E., Collins M. et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*. 2006; 2 (3): e31. doi: 10.1371/journal.pgen.0020031.
27. Pimenta F.C., Roundtree A., Soysal A., Bakir M., du Plessis M., Wolter N. et al. Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (2): 647–652.
28. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (1): 124–131. doi: 10.1128/JCM.44.1.124-131.2006.
29. Centres for disease Control and prevention. Pneumococcal disease. Resources and Protocols. Available at: https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fstreplab%2Fprotocols.html Accessed June 2022.
30. Carvalho M. da G., Tondella M.L., McCaustland K., Weidlich L., McGee L., Mayer L.W., Steigerwalt A., Whaley M., Facklam R.R., Fields B., Carlone G., Ades E.W., Dagan R., Sampson J.S. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug; 45 (8): 2460–2466. doi: 10.1128/JCM.02498-06. Epub 2007 May 30. PMID: 17537936; PMCID: PMC1951257.
31. Blaschke A.J. Interpreting assays for the detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2011 May; 52 Suppl 4 (Suppl 4): S331–7. doi: 10.1093/cid/cir048. PMID: 21460292; PMCID: PMC3069982.
32. Park H.K., Lee H.J., Kim W. Real-time PCR assays for the detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010 Sep 1; 310 (1): 48–53. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02044.x.
33. Sadovy E., Hryniewicz W. Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other *Mitis* streptococci: importance of molecular methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Dec; 39 (12): 2247–2256. doi: 10.1007/s10096-020-03991-9. Epub 2020 Jul 24. PMID: 32710352; PMCID: PMC7669753.
34. Lang A.L.S., McNeil S.A., Hatchette T.F., Elsharif M., Martin I., LeBlanc J.J. Detection and prediction of *Streptococcus pneumoniae* serotypes directly from nasopharyngeal swabs using PCR. *J Med Microbiol*. 2015 Aug; 64 (8): 836–844. doi: 10.1099/jmm.0.000097. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26066632.
35. Tavares D.A., Handem S., Carvalho R.J., Paulo A.C., de Lencastre H., Hinds J., Sá-Leão R. Identification of *Streptococcus pneumoniae* by a real-time PCR assay targeting SP2020. *Sci Rep*. 2019 Mar 1; 9 (1): 3285. doi: 10.1038/s41598-019-39791-1. PMID: 30824850; PMCID: PMC6397248.
36. Kukla R., Bolehovska R., Radocha J., Pliskova L., Zak P., Vrbacky F., Nekvindova J., Zemlickova H. Improved laboratory diagnostics of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory tract samples through qPCR. *New Microbiol*. 2020 Apr; 43 (2): 70–77. Epub 2020 Apr 19. PMID: 32310299.
37. Ricketson L.J., Lidder R., Thorington R., Martin I., Vanderkooi O.G., Sadarangani M., Kellner J.D. PCR and culture analysis of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in healthy children. *Microorganisms*. 2021; 9: 2116. doi: 10.3390/microorganisms9102116.
38. Velusamy S., Tran T., Mongkolrattanothai T., Walker H., McGee L., Beall B. Expanded sequential quadruplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for identifying pneumococcal serotypes, penicillin susceptibility, and resistance markers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020; 97. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115037.
39. Carvalho M., Pimenta F.C., Moura I., Roundtree A., Gertz R.E., Li Z. et al. Non-pneumococcal *mitis*-group streptococci confound detection of pneumococcal capsular serotype-specific loci in upper respiratory tract. *PeerJ*. 2013; 1: e97. doi: 10.7717/peerj.97.
40. Antonio M., Hakeem I., Sankareh K., Cheung Y.B., Adegbola R.A. Evaluation of sequential multiplex PCR for direct detection of multiple serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions. *J Med Microbio*. 2009; 58: 296–302. doi: 10.1099/jmm.0.006031-0.
41. Никитина Е. В., Цветкова И. А., Калиногорская О. С., Гостев В. В., Беланов С. С., Мохов А. С. и соавт. Серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих у детей с респираторными инфекциями, оптимизация молекулярных методов оценки. *Антибиотики и химиотер*. 2021; 66: 11–12: 18–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-18-24>. [Nikitina E.V., Tsvetkova I.A., Kalinogorskaya O.S., Gostev V.V., Belanov S.S., Mokhov A.S. et al. Serotype composition of *Streptococcus pneumoniae* in children with respiratory infections, optimization of molecular assessment methods. *Antibiot i Khimioter*. 2021; 66 (11–12): 18–24. doi: /10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-18-24. (in Russian)]
42. Leung M.H., Bryson K., Freystatter K., Pichon B., Edwards G., Charalambous B.M. et al. Sequotyping: serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single PCR sequencing strategy. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2419–2427.
43. Nagaraj G., Feroze G., Vandana G., Lingegowda R. Development of PCRSeqTyping — a novel molecular assay for typing of *Streptococcus pneumoniae*. *Pneumonia*. 2017; 9 (8). doi: 10.1186/s41479-017-0032-3.
44. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144: 3049–3060.
45. Elberse K.E.M., Nunes S., Sá-Leão R., van der Heide H.G.J., Schouls L.M. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: Comparison with PFGE and MLST. *PLoS ONE*. 2011; 6 (5): e19668. doi: 10.1371/journal.pone.0019668.
46. Миронов К. О., Гапонова И. И., Корчагин В. И., Михайлова Ю. В., Шеленков А. А., Каптелова И. и соавт. Антигенная и генетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98 (5): 512–518. doi: 10.36233/0372-9311-144. [Mironov K.O., Gaponova I.I., Korchagin V.I., Mikhailova Y.V., Shelonkov A.A., Kaptelova V.V. et al. Antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive and non-invasive pneumococcal infections by using high-throughput sequencing. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2021; 98 (5): 512–518. doi: 10.36233/0372-9311-144. (in Russian)]
47. Мартынова А. В., Балабанова Л. А., Чулакова О. А., Шепарёв А. А. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у пациентов пожилого возраста с внебольничными пневмониями. *Современные технологии в медицине*. 2014; 6 (3): 91–96. [Martynova A.V., Balabanova L.A., Chulakova O.A., Sheparov A.A. Molecular epidemiological monitoring of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in elderly patients with common-acquired pneumoniae. *Modern Technologies in Medicine*. 2014; 6 (3): 91–96. (in Russian)]
48. Савинова Т. А., Филимонова О. Ю., Грудина С. А., Сидоренко С. В. Генетическое разнообразие пенициллинустойчивых *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал инфектологии*. 2009; 1(4): 66–71. doi: 10.22625/2072-6732-2009-1-4-66-71. [Savinova T.A., Filimonova O.Y., Grudinina S.A., Sidorenko S.V. Genetic diversity of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Journal Infectology*. 2009; 1 (4): 66–71. doi: 10.22625/2072-6732-2009-1-4-66-71. (in Russian)]
49. Straume D., Stamsås G.A., Håvarstein L.S. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol*. 2015; 33: 371–380. doi: 10.1016/j.meegid.2014.10.020.
50. Straume D., Stamsås G.A., Håvarstein L.S. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol*. 2015; 33: 371–380. doi: 10.1016/j.meegid.2014.10.020.
51. Wyres K.L., Lambertsen L.M., Croucher N.J., McGee L., von Gottberg A., Liñares J. et al. Pneumococcal capsular switching:

- a historical perspective. *J Infect Dis.* 2013; 207: 439–449. doi: 10.1093/infdis/jis703.
52. Beall B.W., Gertz R.E., Hulkower R.L., Whitney C.G., Moore M.R., Brueggemann A.B. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis.* 2011; 203: 1360–1368. doi: 10.1093/infdis/jir052.
 53. Beall B., McEllistrem M.C., Gertz R.E., Wedel S., Boxrud D.J., Gonzalez A.L. et al. Pre- and postvaccination clonal compositions of invasive pneumococcal serotypes for isolates collected in the United States in 1999, 2001, and 2002. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 (3): 999–1017. doi: 10.1128/JCM.44.3.999-1017.2006.
 54. Kaur R., Casey J.R., Pichichero M.E. Emerging *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing the nasopharynx in children after 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in comparison to the 7-valent era, 2006–2015. *Pediatr Infect Dis J.* 2016; 35 (8): 901–906. doi: 10.1097/INF.0000000000001206.
 55. Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н. и соавт. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97 (2): 113–118. doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118. [Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Shelentov A.A., Chagaryan A.N. et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2020; 97 (2): 113–118. doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118. (in Russian)]
 56. Coffey T.J., Enright M.C., Daniels M., Morona J.K., Morona R., Hryniewicz W. et al. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1998; 27 (1): 73–83. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00658.x.
 57. Цветкова И.А., Беланов С.С., Гостев В.В., Калиногорская О.С., Волкова М.О., Мохов А.С. и соавт. Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг. Антибиотики и химиотер. 2019; 64 (5–6): 22–31. doi: 10.24411/0235-2990-2019-100027. [Tsvetkova I.A., Belanov S.S., Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Volkova M.O., Mokhov A.S. et al. Clonality of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia, circulating from 1980 to 2017. *Antibiot i Khimioter.* 2019; 64 (5–6): 22–31. doi: 10.24411/0235-2990-2019-100027. (in Russian)]
 58. Белошицкий Г.В., Королева И.С., Миронов К.О. Фенотипическая и генотипическая характеристика штаммов пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2011; 13 (3): 261–266. [Beloshitskiy G.V., Korolyova I.S., Mironov K.O. Phenotypic and genotypic characteristics of pneumococci isolated from patients with pneumococcal meningitis. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya.* 2011; 13 (3): 261–266. (in Russian)]
 59. Белошицкий Г.В., Королева И.С., Королева М.А. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите, в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2015; 14 (2): 19–25. doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-2-19-25. [Beloshitskiy G.V., Koroleva I.S., Koroleva M.A. Landscape of serotypes pneumococcus isolate with pneumococcal meningitis in the Russian Federation. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2015; 14 (2): 19–25. doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-2-19-25. (in Russian)]
 60. Фельдблюм И.В., Семериков В.В., Голоднова С.О., Николенко В.В., Захарова Ю.А., Воробьева Н.Н. Результаты серотипирования штаммов *Str. Pneumoniae*, циркулирующих на территории г. Перми. *Здоровье семьи — 21 век.* 2013; 2 (2): 194–203. [Feldblum I.V., Semerikov V.V., Golodnova S.O., Nikolenko V.V., Zakharova Yu.A., Vorobyeva N.N. Results of serotyping of *Str. Pneumoniae* strains circulating in Perm. *Zdorov'e sem'i — 21 vek.* 2013; 2 (2): 194–203. (in Russian)]
 61. Козлов Р.С., Сивая О.В., Кречикова О.И. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999–2009: Результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2010; 12 (4): 329–341. [Kozlov R.S., Sivaya O.V., Krechikova O.I., Ivanchik N.V., Study Group «PEHASus». Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Russia over the 1999–2009: Results of multicenter prospective study PEHASus. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2010; 12 (4): 329–341. (in Russian)]
 62. Sidorenko S., Rennert W., Lobzin Y., Briko N., Kozlov R., Namazova-Baranova L. et al. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020; 96: 1–6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114914.
 63. Харит С., Сидоренко С., Рулева А., Перова А., Волкова М., Гостев В. и др. Распространённость пневмококковых пневмоний и отитов у детей младшего возраста (предварительные данные). Вопросы современной педиатрии. 2011; 10 (6): 103–107. [Kharit S., Sidorenko S., Ruleva A., Perova A., Volkova M., Gostev V. et al. Prevalence of pneumococcal pneumoniae and otitis in infants (provisional data). *Current Pediatrics.* 2011; 10 (6): 103–107. (in Russian)]
 64. Garcia-García S., Perez-Arguello A., Henares D., Timoneda N., Muñoz-Almagro C. Rapid identification, capsular typing and molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* by using whole genome nanopore sequencing. *BMC Microbiol.* 2020; 20: 347. doi: 10.1186/s12866-020-02032-x.

Информация об авторах

Захарова Юлия Александровна — Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия. ORCID: 0000-0003-3416-0902

Акимкин Василий Геннадьевич — ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4228-9044

Никитина Екатерина Валерьевна — ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-9737-9496

Иващенко Иван Александрович — Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия. ORCID: 0000-0002-3584-9528

About the authors

Yuliya A. Zakharova — Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russia. ORCID: 0000-0003-3416-0902

Vasily G. Akimkin — Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4228-9044

Ekaterina V. Nikitina — Children's Scientific Clinical Center of Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-9737-9496

Ivan A. Ivashchenko — Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3584-9528

Болгарова Екатерина Викторовна — Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия. ORCID: 0000-0001-6140-2546

Александрова Екатерина Вячеславовна — ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-9171-2286

Скрипковская Светлана Михайловна — ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Ekaterina V. Bolgarova — Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Yekaterinburg, Russia. ORCID: 0000-0001-6140-2546

Ekaterina V. Aleksandrova — Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-9171-2286

Svetlana M. Skripkovskaya — Children's Scientific Clinical Center of Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia

Пневмоцистная пневмония при ревматических заболеваниях: вопросы профилактики

*Г. И. ГРИДНЕВА, Б. С. БЕЛОВ, Е. С. АРОНОВА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия

Pneumocystis Pneumonia in Rheumatic Diseases: Prevention Issues

*GALINA I. GRIDNEVA, BORIS S. BELOV, EVGENIA S. ARONOVA

V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia

Резюме

Частота случаев выявления пневмоцистной пневмонии (ППн) у пациентов с ревматическими заболеваниями (РЗ) продолжает нарастать. Этому способствует, помимо применения цитостатиков и глюкокортикоидов (ГК), всё более широкое применение генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП). Летальность при ППн среди больных РЗ чрезвычайно высока, поэтому вопросы её профилактики стоят как нельзя остро. В работах европейской и американской учёных основное внимание уделяется частоте выявления ППн и определению удельного «веса» тех или иных факторов риска, а рекомендации по профилактике сформулированы с определенной сдержанностью. Представители азиатских врачебных сообществ единодушны в отношении необходимости профилактики ППн, обсуждается лишь дозировка лекарственных препаратов и продолжительность курса лечения.

Ключевые слова: пневмоцистная инфекция; пневмония; профилактика; ревматические заболевания

Для цитирования: Гриднева Г. И., Белов Б. С., Аронова Е. С. Пневмоцистная пневмония при ревматических заболеваниях: вопросы профилактики. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 79–89. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-79-89>.

Abstract

The incidence of pneumocystis pneumonia (PCP) in patients with rheumatic diseases (RD) continues to increase. This is facilitated by the increasing use of genetically engineered biological agents in addition to the use of cytostatics and glucocorticoids. Mortality due to PCP among patients with RD is extremely high, so the issues of its prevention are relevant. European and American scientists focus on the frequency of detection of PCP and the determination of the proportionality of certain risk factors, while the recommendations for prevention are formulated cautiously. Asian medical communities are unanimous in their opinion about the need to prevent PCP, only the dosage of drugs and the duration of the course of treatment are discussed.

Keywords: pneumocystis infection; pneumonia; prevention; rheumatic diseases

For citation: Gridneva G. I., Belov B. S., Aronova E. S. Pneumocystis pneumonia in rheumatic diseases: prevention issues. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 9–10: 79–89. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-79-89>.

Пневмоцистоз как общеклиническая проблема

Пневмоцистоз является оппортунистической инфекцией. По имеющимся данным, среди здорового населения до 10% являются носителями пневмоцист [1]. Микроорганизм *Pneumocystis carinii/jiroveci* (Pj), впервые описанный в 1909 г. К. Шагасом и выделенный в 1912 г. Ф. Деланое в отдельный вид *Pneumocystis carinii*, долгое время

считали безвредным. Однако в 1942 г. была доказана его этиологическая роль в возникновении интерстициальной плазмоклеточной пневмонии, вспышки которой регистрировались у недоношенных и у детей с иммунодефицитными состояниями [1]. Пневмоцистоз, как правило, протекает в виде острого или обострения хронического заболевания органов респираторного тракта, в том числе — интерстициальной пневмонии и даже в фатальных случаях редко выходит за пределы лёгких, что связано с крайне низкой

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Каширское шоссе, 34А, НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, г. Москва, Россия, 115522. E-mail: gigridneva@mail.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 34A Kashirskoe highway, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. E-mail: gigridneva@mail.ru

вирулентностью *Pj*. На фоне нарушенного клеточного иммунитета крайне редко возможно развитие внелёгочных поражений с вовлечением различных органов и тканей, предположительно в результате лимфогенного и гематогенного распространения возбудителя. ППн по сути является маркером иммунодефицитного состояния [1]. У людей с пневмоцистозом отмечается местная или системная продукция антител, не обладающих протективным действием. Макрофаги разрушают пневмоцисты, реализуя цитокиновый механизм и включая реактивные оксиданты. ГК, применяемые при лечении больных, опосредованно снижают фагоцитарную и цитолитическую активность альвеолярных макрофагов, повреждая Fc-рецептор на их мембране. У недоношенных детей с белковой недостаточностью нарушается специфический синтез иммуноглобулинов и, как следствие, может развиваться ППн [1]. В том случае, если ППн протекает как диффузное интерстициальное заболевание лёгких (ИЗЛ) с острым началом, у больных ревматическими заболеваниями (РЗ) не удаётся выявить какие-либо характерные особенности, как это определено у онкологических пациентов, что значительно затрудняет диагностику [2]. Поэтому основным биохимическим маркером *Pj* является выявление в сыворотке повышенных уровней (1–3)- β -D-глюкана. Это соединение представляет собой компонент клеточной стенки большинства патогенных грибов и используется для дифференцировки носительства пневмоцист от ППн, когда есть соответствующие клинические и рентгенологические данные, а также бактериологическое подтверждение и/или положительный ПЦР-тест на содержание ДНК *Pj* в бронхоальвеолярном смыве [3]. При этом гипердиагностика ППн, основанная только на одном определении (1,3)- β -d-глюкана, может быть обусловлена воздействием гемодиализных мембран, внутривенного иммуноглобулина, альбумина, марлевых тампонов или внутривенного введения бета-лактамов антибиотиков [4].

В настоящей публикации будут проанализированы данные литературы по вопросам профилактики ППн у больных РЗ преимущественно за последние 5 лет. При подготовке обзора авторами проведён исчерпывающий поиск литературы (преимущественно англоязычной) в базах данных Medline (через Pubmed) по следующим ключевым словам: «Pneumocystic Pneumonia AND Rheumatic Diseases», «Pneumocystic Pneumonia AND Autoimmune Diseases», «Pneumocystic Infection AND Rheumatic Diseases», «Pneumocystic Infection AND Autoimmune Diseases». Также были рассмотрены материалы крупных ежегодных международных ревматологических конгрессов, проводимых под эгидой EULAR и ACR. В целом было идентифициро-

вано 155 источников, имеющих отношение к данной проблеме.

Трудности в подготовке рекомендаций для пациентов с РЗ подробно изложены нами ранее [5]. Учитывая небольшую распространённость системных РЗ и, казалось бы, низкую частоту ППн в популяции, абсолютное число случаев ППн представлялось небольшим, а значит, ожидалось получение более объективных данных — анализа материалов регистров и эпидемиологических исследований. По данным метаанализа, включавшего 11 905 больных РЗ, частота развития ППн у больных гранулематозным полиангиитом (ГПА) составила 12%, дерматомиозитом/полимиозитом (ДМ/ПМ) — 6%, системной красной волчанкой (СКВ) — 5%, ревматоидным артритом (РА) — 1% [6]. В других работах показана целесообразность назначения профилактики только у тех категорий пациентов, где риск развития ППн равен или превышает 3,5% [7]. Поскольку среди системных РЗ частота ППн значительно варьирует, предполагалось, что рекомендации по профилактике ППн должны быть определены для каждого РЗ в отдельности. Однако полученные в течение последних лет результаты заставляют рассмотреть вопрос профилактики ППн с другой точки зрения.

Распространённость ППн

При анализе всеобщей базы данных стационарных пациентов в Японии, за период с января 2010 г. по декабрь 2016 г. выявлено 4073 взрослых больных ППн, при этом пациенты с РЗ составили 27,1% [8]. В целом, в Японии ежегодно регистрируется около 2300 случаев ППн. За последние годы отмечается тенденция к повышению частоты выявления данной инфекции не только в Азиатском регионе. Так, R. Maini и соавт. [9], используя национальную базу данных Англии, сообщили о том, что ежегодное число случаев ППн увеличилось со 157 в 2000 г. до 352 в 2010 г. При этом случаи ППн участились у пациентов без ВИЧ, особенно — у тех, кто перенёс трансплантацию, у больных гематологическими и злокачественными новообразованиями (ЗНО), а также у больных РЗ [9]. По данным ретроспективного моноцентрового исследования, из всего пула пациентов с РЗ, поступивших в стационар с признаками острой дыхательной недостаточности, у 39,8% диагностирована ППн [10]. Авторы [11] представили наблюдение 6 случаев ППн у пациентов с РЗ (5 больных системными васкулитами (СВ) и один — РА) за годичный период. Четыре из 5 больных СВ находились на комбинированной терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) и преднизолоном (ПЗ), один получал ПЗ в качестве монотерапии, а пациент с РА получал

Существующие рекомендации по профилактике ППн Existing recommendations for PCP prevention

Библиографический источник	Показания для профилактики ППн
N. G. Mansharamani и соавт. [12]	Уровень CD4+ ниже 300/мкл
J. Ogawa и соавт. [13], L. C. Chew и соавт. [14], S. H. Yale и соавт. [15]	Суточная доза ГК превышает 10–30 мг
J. Li и соавт. [16]	Высокие дозы иммунодепрессантов (в первую очередь, пульс-терапия ПЗ), CD4+ ниже 250/мкл
L. K. Stamp и соавт. [17]	Применение иммунодепрессантов или ППн в анамнезе или персистирующая лимфопения и число CD4+ ниже 200/мкл.
D. Gupta и соавт. [18]	Пациенты с СКВ, получающие циклофосфамид (ЦФ) при наличии дополнительных факторов риска: тяжёлая лейко/лимфопения, высокие дозы ГК, гипокомплементемия, люпус-нефрит или высокие показатели активности (SLEDAI).
M. K. Demoruelle и соавт. [19]	Пациенты с системными РЗ в случае наличия 2 или более из следующих критериев: приём ГК ≥ 20 мг/день в течение более четырёх недель, приём двух и более болезнь-модифицирующих препаратов, общее количество лимфоцитов ≤ 350 /мкл, ИЗЛ.
S. Mori, M. Sugimoto [20]	Все пациенты с РА до начала лечения БПВП или ГИБП

метотрексат (МТ) и адалимумаб. Коморбидность была представлена хронической почечной недостаточностью и артериальной гипертензией ($n=3$), сахарным диабетом или ЗНО ($n=2$). Четверо были курильщиками. У 5 пациентов отмечена лимфопения <1000 /мкл. У большинства пациентов развилась ППн в течение первых трёх месяцев после начала приёма ГИБП или ГК. Средняя доза ГК на момент инфицирования *Pj* составляла 30 мг/сут, трое пациентов скончались. Ни один из пациентов не получал профилактическое лечение [11]. Приведённые данные, отражающие опыт всего лишь одного центра, обращают внимание на то, что у пациентов с факторами неблагоприятного прогноза ППн, возможно, протекает настолько быстро, что этиологическая диагностика пневмонии значительно запаздывает. Таким образом, статистика по выявлению ППн среди больных РЗ, может быть заниженной, а суждение о нецелесообразности профилактики — излишне оптимистичным.

Разнообразие рекомендаций по профилактике ППн

В настоящее время опубликован ряд рекомендаций, подготовленных как отдельными научно-исследовательскими центрами, так и медицинскими школами, и отличающихся достаточным разнообразием (таблица).

В одной из новых публикаций Японская коллегия ревматологов рекомендует проводить профилактику ППн всем пациентам с РА, которым назначается метотрексат (МТ), при установлении факта носительства *Pj* [21]. По данным систематического обзора, представленного рабочей группой EULAR, профилактику следует проводить сульфаметоксазолом/триметопримом (СМ/ТМП) (альтернативно атоваквоном (АТ) или пентами-

дином) пациентам, получающих ГК в дозе 15–30 мг/день в течение более 4 нед. К сожалению, в существующем варианте обзора отсутствует конкретная информация о том, следует ли начинать профилактику с 4-й недели терапии, или назначать её при планируемом длительном (более 4 нед.) лечении высокими дозами ГК [22]. Таким образом, заметно смещение фокуса внимания с дискуссии о целесообразности профилактики ППн на поиск прогностических факторов развития ППн у пациентов с РЗ, основанных на анализе данных регистров и больших когорт.

Факторы риска

Учитывая отсутствие единого мнения в ревматологическом сообществе и чётких однозначных рекомендаций для каждой нозологии, целесообразно детально рассмотреть факторы риска ППн, выявленные с использованием больших баз данных. Ранее было показано, что риск ППн увеличивается при приёме 15–20 мг ПЗ в сутки либо приёме двух или более болезнь-модифицирующих препаратов [23, 24]. В дальнейшем внимание исследователей было сосредоточено на выявлении заболеваний, являющихся «территорией особого риска» и «территорией относительной безопасности» в отношении ППн. J. W. Park и соавт. [25] провели крупное наблюдательное исследование, посвящённое профилактике ППн у больных РЗ. Отмечено 1522 эпизода лечения высокими дозами ГК (≥ 30 мг/сут) в течение ≥ 4 нед. у 1092 пациентов за 12-летний период. Сделано заключение о том, что при приёме ГК в дозе ≥ 60 мг/сут польза от профилактики ППн перевешивает риски развития нежелательных реакций (НР), при этом применение СМ/ТМП вызывает меньше НР у больных РЗ, чем у ВИЧ-инфицированных. Однако данная работа подвергалась критике в связи с отсутствием

контрольной группы — больных, не получавших профилактического лечения [26]. В дальнейшем J.W. Park и соавт. [27] изучали значение первичной профилактики СМ/ТП у пациентов с РЗ, получающих длительно небольшие дозы ГК. Проанализировано 28 292 эпизода лечения ГК за 14-летний период. В группе пациентов, получающих ГК менее 15 мг/сут, относительный риск развития ППн составил $<0,1$ на 100 пациенто-лет (ПЛ), следовательно, применение профилактики в этой группе, по заключению авторов, является обоснованным. В группе пациентов, получающих средние дозы ГК (среди которых 44,4% составили больные СКВ, остальные — ДМ/ПМ, ГПА или микроскопическим полиангиитом (МПА), реже — болезнью Бехчета), профилактика проводилась в 45 (4,2%) случаях. В этой группе присутствовало больше больных с ИЗЛ, чаще проводилась пульс-терапия ГК (250–1000 мг/сут метилпреднизолона в течение 1–3 дней) и ЦФ (перорально или внутривенно). В группе больных, не получавших профилактического лечения, чаще применялись микрофенолата мофетил (ММФ) и МТ. Авторы заключают, что у пациентов с наличием факторов высокого риска (пульс-терапия ГК, высокая кумулятивная доза ГК, лимфопения <800 /мкл) и сопутствующим лечением ЦФ польза от профилактики ППн может превышать потенциальный риск развития НР.

Китайские учёные провели когортное исследование больных ревматологического профиля в Гонконге [28]. Из 21 587 пациентов, включённых в региональный регистр с 2015 по 2019 гг. (54% — РА, 25 — СКВ, 13% — спондилоартрит (СПА), 5% — ПМ/ДМ, 2% — АНЦА-ассоциированные васкулиты (ААВ) и 1% — ССД), профилактика ППн была назначена у 1141 (5,3%) больного. У 48 (0,2%) пациентов развилась ППн, при этом ни один из них не получал профилактику. Заболеваемость Рj была самой высокой среди пациентов с ССД, ААВ и ПМ/ДМ. Среди этой подгруппы в большинстве случаев ППн развилась у пациентов, получавших ПЗ ≥ 15 мг/сут. Зафиксировано 19 летальных исходов ППн, а уровень смертности составил 39,6%.

Согласно результатам большинства работ, пациенты с ПМ/ДМ наиболее часто развивают ППн [5]. Распространённость ППн у больных ПМ/ДМ, позитивных по MDA5 (анти-MDA5, антитело против дифференцировки меланомы 5-го гена) составляет — 7,5/100 ПЛ, тогда как у больных ПМ/ДМ, негативных по MDA5, — 0,7/100 ПЛ ($p<0,05$). Пациенты с MDA5+, имеют, как правило, более тяжёлое течение РЗ, получают терапию более высокими дозами ГК, имеют значительное снижение количества CD4+ Т-клеток и лимфоцитов ($p<0,05$), а при развитии ППн — более высокий уровень 3-месячной смертности в результате ППн и её осложнений (83,3 и 38,9%, соответственно,

$p<0,05$). Как правило, быстрая диагностика и начало лечения не способствовали улучшению прогноза этой категории пациентов, в отличие от пациентов с другими РЗ, у которых выживаемость улучшалась, если лечение против Рj было начато в течение 6 дней ($p<0,05$) [29].

На основании данных о 103 117 пациентах, включённых в регистр, группа учёных из Тайваня сделала вывод, что само наличие РЗ резко повышает предрасположенность пациентов к ППн, при этом максимальный риск отмечается при ПМ/ДМ. Также весомыми рисками являются мужской пол, пожилой возраст, ЗНО, ВИЧ и ИЗЛ, приём иммунодепрессантов: МТ, ЦФ, ММФ, ГИБП, циклоспорина (ЦС). ММФ, по-видимому, является более значимым фактором риска, чем ЦФ. Отдельно подчёркнуто, что наибольший риск представляет приём ГК более 10 мг/сут [30].

Z. Zhao и соавт. [31], помимо высоких доз ГК и недавнего начала иммуносупрессивной терапии, к факторам риска также относят лечение ЦС. Yu. Ishikawa и соавт. [32], используя крупную японскую национальную базу данных, показали, что смертность при ППн у пациентов с РЗ составляет более 30%, а пожилой возраст и сопутствующее ИЗЛ являются факторами неблагоприятного течения инфекции Рj. Из 15901766 больных, госпитализированных в 2014–2016 гг., было отобрано 333 пациента с ППн, страдающих РЗ. Пациенты были разделены на две группы: «РА-подобные заболевания (включая серопозитивный, серонегативный РА и ревматическую полимиалгию)» — 15,6% от общего количества, и «не-РА-подобные заболевания», треть которых составили больные с СВ, реже — ПМ/ДМ, СКВ и другие. ГК назначали почти всем больным (96,7%), пульс-терапия ГК проводилась в 30,9% случаев. Группы выживших и не выживших больных не отличалась по количеству пациентов с «РА-подобными» заболеваниями. Группы статистически значимо различались по количеству больных СВ (в группе не выживших их было почти в два раза больше — 46 и 28%, соответственно). Наличие СВ не подтвердило свою значимость при многофакторном анализе, возможно, в связи с тем, что большинство этих больных были старше, чем в общей когорте (средний возраст 74,3 и 68,2 года, соответственно; $p<0,001$). 30-дневная и 60-дневная выживаемость значительно снижались с увеличением возраста. Авторы заключают, что, вероятно, не столько диагноз, сколько наличие ИЗЛ и возраст являются неблагоприятными прогностическими факторами.

T. Kageyama и соавт. [33] ретроспективно сопоставили исходные клинику-демографические характеристики и проводимую иммуносупрессивную терапию с выживаемостью при развитии ППн у 95 пациентов с РЗ (45 «РА-подобные» и 50 «не-РА-подобные заболевания»), последовательно

включённых в исследование. Умершие от ППн пациенты (44,2%) были старше ($p=0,008$), у них чаще имелось фоновое заболевание лёгких (47,6 и 13,2%, соответственно, $p<0,001$). Медиана количества лимфоцитов на момент выявления ППн была ниже у погибших, чем у выживших (499/мкл и 874/мкл, соответственно, $p=0,002$). По данным многофакторного анализа, низкое количество лимфоцитов, пожилой возраст и сопутствующее заболевание лёгких являются независимыми факторами риска смерти от ППн [33].

Терапия ГИБП как фактор риска ППн

Крупное когортное исследование, проведённое коллективом авторов из Японии (3787 больных РА из университетского регистра FIRST), показало, что пожилой возраст, высокий ИМТ, сопутствующие заболевания лёгких, лимфопения и низкий уровень IgG в сыворотке повышают риск развития ППн. В этот регистр для долгосрочного обсервационного исследования включались все пациенты при назначении нового ГИБП или тсБПВП. С августа 2003 г. по сентябрь 2009 г. профилактика ППн применялась на основании мнения лечащего врача в момент назначения нового ГИБП или тсБПВП либо смены препарата с учётом различных факторов, таких как возраст участника, способность выполнять повседневные действия, коморбидность, уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаргатаминотрансферазы (АСТ), скорость клубочковой фильтрации, состояние лёгких и инфекционные заболевания в анамнезе (группа 1, $n=807$). С октября 2009 г. профилактика ППн назначалась на основании опубликованных критериев, к которым относились возраст ≥ 65 лет, наличие заболевания лёгких, сопутствующее использование пероральных ГК, также учитывалось мнение лечащих врачей (группа «стратегической профилактики» 2, $n=2980$). На протяжении всего исследования наблюдалось 26 случаев ППн. После введения стратегической профилактики ППн заболеваемость снизилась с 0,51/100 ПЛ до 0,21/100 ПЛ. Следует отметить, что у 8 участников на протяжении всего исследования развилась ППн, несмотря на то что они получали профилактическое лечение. 11,4% участников прекратили регулярный приём СМ/ТМП из-за НР. С 2012 г. профилактическая доза СМ/ТМП была снижена, что не привело к повышению заболеваемости ППн. Охват профилактикой увеличился с течением времени, несмотря на снижение средней дозы СМ/ТМП и заболеваемости ППн. Субанализ данных 929 пациентов из обеих групп, не получавших профилактику, показал, что пожилой возраст, высокий ИМТ, сопутствующие заболевания лёгких, низкий уровень лимфоцитов

и низкий уровень IgG в сыворотке повышают риск развития ППн [34].

По результатам исследования «случай–контроль», в которое включались пациенты с РА, получавшие инфликсимаб, Y. Komano и соавт. [35] сообщили, что все пациенты с ППн ($n=21$) также принимали МТ (в среднем 8 мг в неделю) и ГК (в среднем 7,5 мг/сут).

В обзоре добровольных сообщений о нежелательных явлениях, выполненном Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) от 19 мая 2019 г., частота ППн при применении инфликсимаба и этанерцепта составила 2,3 и 1,6 на 100 000 ПЛ, соответственно. Большинство пациентов одновременно принимали и другие иммунодепрессанты [36]. Приём анти-В-клеточного препарата ритуксимаба (РТМ) некоторые авторы относят к факторам особого риска возникновения ППн. М. L. Calero-Bernal и соавт. [37] сообщили, что 23% пациентов с ППн без ВИЧ, получали именно РТМ. К. Alexandre и соавт. [38] провели ретроспективный обзор 11 случаев ППн, развившейся на фоне терапии РТМ больных РЗ. Десять (91%) пациентов также принимали ГК в средней дозе 30 мг/сут. Обзор литературы, включавший 18 случаев, выявил аналогичные результаты. В мае 2022 г. группа авторов под руководством J. W. Park [39] опубликовала результаты работы по выявлению ППн у пациентов, получающих РТМ. В ретроспективное исследование было включено 3524 пациента, из которых 559 страдали РЗ, остальные имели гематологическое заболевание или перенесли трансплантацию органов. Профилактическое лечение получал 1001 пациент. В течение 2759,9 ПЛ произошло 92 инфицирования *Pj* с уровнем смертности 27,2%. Среди пациентов, получавших профилактику, ППн встречалась значимо реже, чем в контрольной группе (скорректированное отношение рисков 0,20 [95% ДИ, 0,10–0,42]). Частота НР, связанных с СМ/ТМП, составляла 18,1 (14,6–22,2)/100 ПЛ, и большинство из них были лёгкой и средней степени тяжести. Зафиксировано 10 случаев серьёзных НР [39]. Таким образом, профилактика СМ/ТМП значительно снижает заболеваемость ППн при приемлемом профиле безопасности у пациентов, получающих РТМ. Ценность этих результатов возрастает, если учитывать тот факт, что при РЗ нередко выявляется сопутствующая гематологическая патология, требующая, в конечном итоге, назначения именно РТМ.

В работе американских авторов, использовавших данные университетской системы здравоохранения (University Healthcare System) с охватом более 750 000 пациентов, проведён анализ наблюдений 316 больных из групп общепризнанно высокого риска (ГПА, МПА) и так называемого «промежуточного» риска (ДМ/ПМ, СКВ). Все пациенты

получали терапию высокого риска: азатиоприн (АЗА), ЦФ, МТ, ММФ, РТМ или высокие дозы ГК (≥ 20 мг/сут). Расчёты проводились с учётом коморбидности (индекс Чарлсона). 39% пациентов получали профилактическую терапию СМ/ТМП. Профилактику ППн значимо чаще получали больные, находившиеся на терапии ЦФ (77%), по сравнению с РТМ (68%), высокими дозами ГК (39%), АЗА (33%), ММФ (21%) и МТ (21%), $p < 0,001$ во всех случаях. Среднее количество лейкоцитов было несколько ниже у пациентов, не получавших профилактики. В течение 640 ПЛ (в среднем, 23 месяца наблюдения) ни у одного из пациентов не было ППн. При этом НР встречались у 3% пациентов ежегодно, в том числе один случай серьёзной токсической реакции. Особенностью исследования является то, что пациенты, принимавшие СМ/ТМП менее 30 дней, согласно дизайну, были отнесены к категории «не получавших профилактики», что, возможно, указывает на возможность успешной профилактики ППн короткими курсами [40].

Группы РЗ «невысокого» риска

Раннее отношение к *Pj* как к микроорганизму, менее опасному в отношении пациентов с воспалительными заболеваниями суставов, подкреплялось, в частности, работой S. Mогi и соавт. [41], которые представили данные о бессимптомном течении пневмоцистной инфекции у больных РА. По данным австралийского регистра, среди пациентов с воспалительными заболеваниями суставов (РА, $n=8490$, АС, $n=1419$), псориатический артрит (ПСА, $n=601$) ППн встречалась только среди больных РА, причём частота её повышалась с 1985 по 1996–2000 гг., затем снижалась практически до нулевых значений [42]. По данным этого же регистра, единичные случаи ППн (0,4 на 1000 ПЛ) встречались преимущественно у пациентов с СВ, причём после 2000 г. таких больных не наблюдалось [43]. Возможно, в данном случае речь может идти о географических и этнических особенностях, поскольку данные этого регистра отличаются от таковых, полученных учёными других частей света.

Настороженность в отношении ППн у пациентов с РЗ, при которых риск данной инфекции представляется, на первый взгляд, невысоким, должна сохраняться. I. Grigoropoulos и соавт. [44] опубликовали наблюдение ППн у больной РА 79 лет, которая не имела факторов риска развития ППн. Заболевание началось с тахипноэ (28 вдохов/мин), лихорадки (38,2°C) и появления двусторонних экспираторных хрипов. Насыщение кислородом составляло 90% на воздухе. КТ грудной клетки показала диффузные затемнения по типу «матового стекла», особенно в верхних долях. Лабо-

рные данные при поступлении выявили гипонатриемию (132 мЭкв/л), умеренное повышение ЛДГ (292 ЕД/л, норма < 220 ЕД/л), повышение СРБ (88 мг/л, < 5 мг/л) и лимфопению (абсолютное количество лимфоцитов = 700/мкл). Диагноз был установлен на основании выявления ДНК *Pj* в индуцированной мокроте. J. Lourenço и соавт. [45] представили наблюдение 55-летней пациентки с ПСА, позитивным по АЦЦП, находившейся в ремиссии, которая была достигнута на фоне лечения МТ в дозе 15 мг в неделю. Через 4 мес применения МТ больная обратилась к врачу общей практики с жалобами на одышку при физической нагрузке, которая сохранялась в течение 2 нед, повышение температуры тела до 39°C, непродуктивный кашель, при обследовании — снижение сатурации, нормальные результаты общеклинического анализа крови, СРБ — 7,17 (норма — до 5) мг/л, ЛДГ 360 — ЕД/л. Микроскопия мокроты на наличие пневмоцист, посев крови на стерильность, серологические реакции на *H.influenzae*, *S.pneumoniae* и *M.pneumoniae*, мазок из носоглотки на аденовирусы оказались отрицательными. Только окраска с метенамином серебра Грокотта (GMS) материала, полученного при бронхоальвеолярном лаваже, выявила небольшое количество кистозной формы *Pj*, ПЦР подтвердила наличие *Pj*. В сыворотке был повышен уровень (1–3)- β -D-глюкана до 249 ЕД/мл. На фоне лечения концентрация этого маркера значительно снизилась. Авторы обращают внимание на то, что пациентка не относилась к группе высокого риска, не имела исходной лимфопении, однако предположили, что лимфопения могла отмечаться ранее и способствовать развитию ППн. Отсутствие промежуточных анализов на фоне лечения МТ не позволяет однозначно судить об этом [45]. Данный случай возвращает нас к необходимости тщательного контроля за лабораторными показателями пациентов, принимающих МТ.

Традиционную настороженность в отношении инфекции *Pj* даже у пациентов с РА проявляют японские ревматологи. S. I. Ohmura и соавт. [46] исследовали факторы риска развития ППн у 334 пациентов с РА, получающих МТ в качестве монотерапии или комбинации с другими БПВП не менее 1 года, в рамках моноцентрового ретроспективного когортного исследования. Ни один пациент не получал профилактическую терапию. У 13 пациентов отмечалось развитие ППн, особенностями данной группы являлись более низкие уровни сывороточного альбумина, более высокая частота лёгочных заболеваний (ХОБЛ — 2, ИЗЛ — 4), частое применение комбинированной терапии с другими БПВП и более высокая доза ГК. Интересно, что четверо из 13 пациентов с ППн не получали ГК, а только у 2 больных суточная доза ПЗ превышала 10 мг.

Многофакторный регрессионный анализ Кокса показал, что одновременное применение ГК с другими БПВП и уровень сывороточного альбумина $<3,5$ мг/дл были факторами риска развития ППн на фоне терапии МТ (ОР 4,30, $p=0,01$). При наличии указанных факторов риска кумулятивная вероятность развития ППн значительно повышалась.

В исследовании «случай–контроль», выполненном T. Nishikawa и соавт. [47], продемонстрирован протективный эффект сульфасалазина (СС). С 2003 по 2017 гг. в Metropolitan Tama Medical Center среди больных РА выявлено 119 случаев, подозрительных на ППн. В 36 случаях инфекция *Pj* подтверждена методом ПЦР, в 83 случаях — не подтверждена (эти больные составили контрольную группу). В группе «случаев» ни один пациент не принимал СС, в группе контроля — 18. Кроме этого, в группе «случаев» достоверно чаще пациенты принимали МТ. Примечательно, что информация о ВИЧ-инфицированности среди пациентов в данном исследовании не фиксировалась, однако в группе контроля 16 больных принимали профилактическое лечение против *Pj*. Среди пациентов, получавших профилактическое лечение, случаев ППн не наблюдали.

Эффективность и безопасность профилактики ППн

N. Honda и соавт. [48] изучили результаты назначения профилактики ППн в рутинной практике у пациентов РЗ, обработав данные национального регистра за период 2003–2018 гг. В когорту вошли 437 пациентов (средний возраст — 62 года, преобладали женщины — 69%), госпитализированных в Tokyo Metropolitan Tama Medical Centre и нуждавшихся в приёме ≥ 50 мг ГК, не инфицированных ВИЧ, не болевших ранее ППн, с различными ревматологическими диагнозами — СКВ (24,7%), ПМ/ДМ (21,1%), РА (11,2%), МПА (9,4%), ГПА (3,7%), эозинофильным гранулематозом с полиангиитом (4,6%), синдромом Шегрена (2,3%), узелковым полиартериитом (3,9%), гигантоклеточным артериитом (5%), болезнью Стилла взрослых (БСВ) (4,1%), другими РЗ (10%). Период наблюдения составил всего 4 мес., поскольку в дальнейшем доза ГК у большинства пациентов была снижена. 376 (86% от общего количества) пациентов — основная группа — начинали профилактический приём СМ/ТМП в дозе $\leq 400/80$ мг не более чем через 1 мес. после назначения высоких доз ГК. В группу контроля вошёл 61 пациент, не получавший профилактическое лечение. Группы не различались по частоте применения пульс-терапии ГК. В группе профилактики 76 (20,2%) пациентов завершили приём СМ/ТМП, из них

70 (18%) — в связи с НР (цитопения — 26 случаев, сыпь — 23, нарушение электролитного баланса — 10, нарушение функции почек — 6, нарушение печёночной функции — 5). За время наблюдения у 3 пациентов с СКВ развилась ППн, ни один из них не получал профилактику. На момент возникновения ППн доза ГК составила 60 мг/сут у одного пациента и 30 мг/сут — у двоих. Авторы подчёркивают, что профилактика СМ/ТМП эффективно предотвращает ППн у пациентов, получающих высокие дозы ГК, однако она должна быть отменена при снижении дозы ГК, поскольку длительный приём этих препаратов способствует более высокому риску прочих инфекций, прежде всего, за счёт развивающейся лейкопении. Для уменьшения риска НР авторы рекомендуют использовать сниженные дозы СМ/ТМП. Несмотря на определённые погрешности, результаты данной работы можно считать убедительными. Таким образом, одним из путей снижения частоты развития НР является применение коротких курсов профилактической терапии.

Длительное время применение СМ/ТМП оставалось единственным способом как профилактики, так и лечения ППн. В качестве альтернативы для профилактики ППн в настоящее время используются также АТ или аэрозольный пентамидин, но данные об их эффективности у пациентов с РЗ недостаточны [49, 50]. АТ является противопаразитарным препаратом, который используется для профилактики ППн у больных, не инфицированных ВИЧ, с непереносимостью СМ/ТМП. Обычно АТ хорошо переносится, но следует иметь в виду, что его биодоступность значительно снижается при приёме натошак по сравнению с таковым после еды [51], а более низкая концентрация в плазме может привести к неадекватной профилактике.

В ходе ретроспективного одноцентрового исследования S. Jinno и соавт. [52] сравнили эффективность и безопасность профилактического применения СМ/ТМП и АТ у пациентов с РЗ (СКВ, ПМ/ДМ, СВ и др.), получавших терапию ГК в дозе более 20 мг/сут в течение ≥ 4 нед. Пациенты получали профилактику, начиная с 1-го дня лечения ГК в дозе 20 мг/сут и выше. 383 пациента принимали СМ/ТМП, 12 — АТ и 5 — пентамидин. Среди 383 пациентов из группы СМ/ТМП у 102 (26,6%) развились НР, из-за которых лечение было прекращено в течение 4 нед. после начала цитопения — 44 (11,5%) случая, кожная сыпь — 24 (6,3%), повышение АЛТ и/или АСТ — 23 (6,0%), повышение креатинина — 16 (4,2%), нарушение электролитного баланса — 11 (2,9%).

Частота прекращения лечения СМ/ТМП среди больных РЗ значительно выше, чем у пациентов без РЗ, это подтверждают результаты более ранних работ [53, 54]. Из 102 пациентов, прекративших

приём СМ/ТМП, 98 были переключены на приём других препаратов (95 — АТ и 3 — пентамидин), четверо полностью прекратили профилактику. При этом ни один пациент, принимавший АТ, не прекратил лечение из-за НР. В дальнейшем пациенты были разделены на группы, принимавших СМ/ТМП ($n=281$) и АТ ($n=107$). Переносимость СМ/ТМП в 142 случаях была хорошей, у остальных больных доза препарата снижена вдвое из-за НР. Всего за 397,0 ПЛ (307,7 в группе СМ/ТМП и 89,3 в группе АТ) зарегистрировано 7 случаев ППн (2 в группе СМ/ТМП, причём при лечении половинной дозой, и 5 — АТ) с коэффициентом смертности 54,5%. Пациенты в группе АТ были старше, у них чаще встречались хронические заболевания лёгких и лимфопения, а также чаще применяли пульс-терапию ГК, ЦФ. После поправки на различия в исходных характеристиках между двумя группами скорректированная кумулятивная заболеваемость ППн была одинаковой (ОР 0,97; 95% ДИ 0,19–5,09; $p=0,97$). У больных СКВ риск НР при лечении СМ/ТМП был значительно выше, чем у пациентов с другими РЗ.

S. Izuka и соавт. [52] провели ретроспективное исследование, в которое включили 424 пациента с РЗ (СКВ — 162; другие заболевания соединительной ткани (ЗСТ) — 262), получавших СМ/ТМП 400/80 мг. У 22 больных СКВ (13,6%) развились НР, что было значимо выше, чем у пациентов с другими ЗСТ ($n=18$ [6,9%], $p=0,033$). У пациентов с СКВ однофакторный анализ выявил прямую связь НР с наличием анти-Sm-антител ($p<0,001$), анти-RNP ($p=0,02$) и анти-Ro/SS-A ($p=0,042$). Многофакторный анализ выявил значимую связь между уровнями анти-Sm-антител и развитием НР (скорректированное отношение шансов 5,27, 95% доверительный интервал 1,80–15,40, $p=0,002$) [52]. Коллективом японских авторов была проведена работа по описанию НР при профилактике ППн у пациентов одного центра в интервале 2012–2019 гг., которые были госпитализированы для купирования активности заболевания. Группа из 438 пациентов была представлена больными СКВ (25,3%), АНЦА-вакулитами (15,5%), РА (11,6%), ПМ/ДМ (10,7%), IgG4-связанным заболеванием (8,5%), васкулитом крупных сосудов (7,1%), БСВ (4,1%), и другими (17,2%). 82 больных (18,7%) прекратили профилактическое лечение из-за НР. Наиболее частыми НР оказались сыпь (36,6%), повышение АЛТ и/или АСТ (29,3%), тромбоцитопения (19,5%), повышение креатинина (15,9%), гиперкалиемия (14,6%), гипонатриемия (11%), лейкопения (6,1%), лихорадка (6,1%). В группе НР значимо более высоким был возраст больных ($61,4\pm 16,4$ и $56,3\pm 16,9$ лет, соответственно, $p=0,014$) и суточная доза ГК (0,97 и 0,91 мг/кг/день, соответственно, $p=0,03$). Наиболее часто НР развивались среди пациентов с БСВ по сравнению с группой в целом (66,7 и 16,7%, соответственно, $p<0,05$) [53].

В июле 2020 г. были опубликованы результаты 52-недельного открытого рандомизированного контролируемого исследования СМ/ТМП для профилактики ППн у больных с РЗ, получавших ПЗ $\geq 0,6$ мг/кг/сут. В ходе работы изучали долгосрочную профилактическую эффективность, удержание профилактической терапии и безопасность низких доз СМ/ТМП для профилактики ППн. 58 больных были рандомизированы в группу с дозировкой СМ/ТМП 400/80 мг в сутки, 59 — в группу половинной дозировки (200/40 мг в сутки). У 55 больных лечение начинали с 40/8 мг с постепенным повышением дозы до 200/40 мг в сутки. Фаза лечения составляла 24 недели, далее больные наблюдались до 52 нед. Не зафиксировано ни одного случая ППн, при этом число НР было статистически значимо выше в группе полной дозы СМ/ТМП, чем в двух других группах [54]. T. Narada и соавт. [55] сравнили результаты профилактики ППн у 145 пациентов, получавших полную дозу СМ/ТМП (400/80 мг ежедневно) и 75 пациентов, получавших сниженную дозу (800/160 мг 3 раза в неделю). В работе продемонстрирована одинаковая эффективность лечебных схем при меньшей частоте НР в группе сниженной дозировки. Таким образом, ещё одним способом уменьшения частоты развития НР является уменьшение дозировок профилактических препаратов без ущерба для эффективности профилактики.

Риски пневмоцистной инфекции в эпоху COVID-19

Диагностика ППн особенно сложна в эпоху пандемии COVID-19, поскольку заболевания имеют сходную клиническую картину [56] и данные КТ органов грудной клетки [57]. Для своевременной дифференциальной диагностики COVID-19 и ПП рекомендуется посев мокроты или ПЦР [58]. Пневмоцистная инфекция, протекающая параллельно с COVID-19, многократно повышает риск летального исхода. Инфекция SARS-CoV2 провоцирует развитие так называемой функциональной иммуносупрессии, связанной со снижением CD4+-лимфоцитов, которое, как уже упоминалось, является predisposing фактором ППн [59]. I. Gentile и соавт. [60] сообщили о 5 случаях развития ППн после клинического разрешения пневмонии, вызванной COVID-19. У 4 пациентов не было факторов риска развития ППн на момент постановки диагноза COVID-19. Тем не менее, в исходе COVID-19 все пациенты имели как минимум один фактор риска развития ППн, поскольку они получали ГК в высоких дозах не менее 14 дней, при этом у трёх больных число CD4+ было <200 /мкл. После своевременного назначения СМ/ТМП достигнуто значимое улучшение во всех случаях. Авторы сделали вывод, что использование

ГК для лечения нарушений дыхания при COVID-19, по-видимому, является наиболее распространённым фактором риска ППн, наряду с вирусной и ятрогенной лимфопенией. Ухудшение дыхательной функции и характерная картина при лучевой диагностике во время или после разрешения пневмонии в рамках COVID-19 должны вызвать подозрение на ППн даже у иммунокомпетентных пациентов. Авторы предложили рассматривать возможность первичной профилактики ППн у отдельных пациентов с COVID-19 из групп высокого риска.

Заключение

На основании данных, полученных за последние годы, можно уверенно считать вопрос профилактики ППн чрезвычайно актуальным. Ряд опубликованных работ, основанных на анализе материала регистров и крупных когорт, ставит под сомнение однозначность утверждения об опасности только высоких доз ГК (30 мг/сут и более), доминировавшую ранее в дискуссиях о целесообразности профилактики ППн. В двух процитированных работах фактором риска ППн названа доза 20 мг/сут, в двух — 15 мг/сут, в двух — 10 мг/сут и в одной — 7,5 мг/сут. Создаётся впечатление, что азиатский регион является эндемичным по пневмоцистной инфекции, однако

оно может быть ошибочным в связи с разной степенью внедрения методов дифференциальной диагностики у пациентов с ИЗЛ в странах Азии по сравнению с другими регионами, в том числе Российской Федерацией. По некоторым данным, НР при профилактическом приёме СМ/ТМП развиваются чаще у пациентов и СКВ и БСВ, пожилой возраст также является фактором риска развития НР при лечении этими препаратами. Эффективным способом уменьшить риск НР является использование сниженных дозировок и/или короткого курса СМ/ТМП.

Дополнительная информация

Статья подготовлена в рамках научно-исследовательских работ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой». № государственного задания 1021051503137-7. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Участие авторов. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Литература/References

1. Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Корниенко М.Н., Юдицкий М.В. Пневмоцистоз — актуальная иммунодефицит-ассоциированная инфекция: Методические рекомендации. М.: 2009; 75. [Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Kornienko M.N., Jyuditskij M.V. Pnevmo-tsistoz — aktual' naya immunodefitsit-assotsirovannaya infektsiya: Metodicheskie rekomendatsii. Moscow: 2009; 75. (in Russian)]
2. Furukawa H., Oka S., Shimada K. et al. Serum metabolomic profiles of rheumatoid arthritis patients with acute-onset diffuse interstitial lung disease. *Biomark Insights*. 2019 Aug 22; 14: 1177271919870472. doi: 10.1177/1177271919870472. eCollection 2019.
3. Kovacs J.A., Masur H. Evolving health effects of Pneumocystis: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA*. 2009 Jun 24; 301 (24): 2578–2585. doi: 10.1001/jama.2009.880.
4. Menon A.A., Berg D.D., Brea E.J. et al. A case of COVID-19 and zneumocystis jirovecii coinfection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jul 1; 202 (1): 136–138. doi: 10.1164/rccm.202003-0766LE.
5. Белов Б.С., Тарасова Г.М., Буханова Д.С. Профилактика пневмоцистной пневмонии у пациентов с ревматическими заболеваниями: проблемы и поиск решений. *Антибиотики и химиотер*. 2019; 64 (5–6): 77–89. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10035>. [Belov B. S., Tarasova G. M., Bukhanova D. S. Prevention of pneumocystic pneumonia in patients with rheumatic diseases: problems and solutions. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2019; 64 (5–6): 77–89. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10035>.
6. Ward M.M., Donald F. Pneumocystis carinii pneumonia in patients with connective tissue diseases: the role of hospital experience in diagnosis and mortality. *Arthritis Rheum*. 1999; 42 (4): 780–789. doi: 10.1002/1529-0131(199904)42:4<780::AID-ANR23>3.0.CO;2-M.
7. Green H., Paul M., Vidal L., Leibovici L. Prophylaxis of Pneumocystis pneumonia in immunocompromised non-HIV-infected patients: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin Proc*. 2007; 82 (9): 1052–1059. doi: 10.4065/82.9.1052.
8. Shoji K., Michihata N., Miyairi I. et al. Recent epidemiology of Pneumocystis pneumonia in Japan. *J Infect Chemother*. 2020 Dec; 26 (12): 1260–1264. doi: 10.1016/j.jiac.2020.07.006. Epub 2020 Aug 1.
9. Maini R., Henderson K.L., Sheridan E.A. et al. Increasing Pneumocystis Pneumonia, England, UK, 2000–2010. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19 (3): 386–392. doi: 10.3201/eid1903.121151.
10. Shi Y., Du B., Zhao J.L. et al. Etiologies and outcomes of rheumatology patients with acute respiratory failure requiring intensive care: a single-center medical records review study of 259 patients. *Clin Rheumatol*. 2020 Nov; 39 (11): 3479–3488. doi: 10.1007/s10067-020-05080-w. Epub 2020 May 6.
11. Escudero Siosi A., Andersson M., Woodrow C., Dubey S. AB1074 fatal but preventable — single centre series of 6 cases of pneumocystis jirovecii pneumonia (PJP) in patients with auto-immune inflammatory rheumatic disease (AIIRD) in one year. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2022; 81: 1657. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2022-eular.2500>
12. Mansharamani N.G., Balachandran D., Vernovsky I. et al. Peripheral blood CD4 + T-lymphocyte counts during pneumocystis carinii pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest*. 2000; 118 (3): 712–720. doi: 10.1378/chest.118.3.712.
13. Ogawa J., Harigai M., Nagasaka K. et al. Prediction of and prophylaxis against pneumocystis pneumonia in patients with connective tissue diseases undergoing medium- or high-dose corticosteroid therapy. *Mod Rheumatol*. 2005; 15 (2): 91–96. doi: 10.1007/pl00021707.
14. Chew L.C., Maceda-Galang L.M., Tan Y.K. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with autoimmune disease on high-dose glucocorticoid. *J Clin Rheumatol*. 2015 Mar; 21 (2): 72–75. doi: 10.1097/RHU.0000000000000215.
15. Yale S.H., Limper A.H. Pneumocystis carinii pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illnesses and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc*. 1996; 71 (1): 5–13. doi: 10.4065/71.1.5.
16. Li J., Huang X.M., Fang W.G., Zeng X.J. Pneumocystis carinii pneumonia in patients with connective tissue disease. *J Clin Rheumatol*. 2006; 12 (3): 114–117. doi: 10.1097/01.rhu.0000221794.24431.36.
17. Stamp L.K., Hurst M. Is there a role for consensus guidelines for P. jirovecii pneumonia prophylaxis in immunosuppressed patients with rheumatic diseases? *J Rheumatol*. 2010; 37 (4): 686–688. doi: 10.3899/jrheum.091426.

18. Gupta D., Zachariah A., Roppelt H. et al. Prophylactic antibiotic usage for Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with systemic lupus erythematosus on cyclophosphamide: a survey of US rheumatologists and the review of literature. *J Clin Rheumatol*. 2008; 14 (5): 267–72. doi: 10.1097/RHU.0b013e31817a7e30.
19. Demoruelle M.K., Kahr A., Verilhac K. et al. Recent-onset systemic lupus erythematosus complicated by acute respiratory failure. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013; 65 (2): 314–323. doi: 10.1002/acr.21857.
20. Mori S., Sugimoto M. Pneumocystis jirovecii pneumonia in rheumatoid arthritis patients: risks and prophylaxis recommendations. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*. 2015 Sep 6; 9 (Suppl 1): 29–40. doi: 10.4137/CCRP.M.S23286. eCollection 2015.
21. Kameda H., Fujii T., Nakajima A. et al. Japan College of Rheumatology subcommittee on the guideline for the use of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Japan College of Rheumatology guideline for the use of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2019; 29 (1): 31–40. doi: 10.1080/14397595.2018.1472358. Epub 2018 May 24.
22. Fragoulis G.E., Dey M., Zhao S.S. on behalf of EULAR Task Force for the screening and prophylaxis of chronic and opportunistic infections in Autoimmune Rheumatic Diseases et al. POS1179 Systematic literature review on the screening and prophylaxis of chronic and opportunistic infections *Ann Rheum Dis*. 2022; 81: 917–918. doi: 10.1136/ard-2022-223335. Online ahead of print.
23. Tadros S., Teichtahl A.J., Ciciriello S., Wicks I.P. Pneumocystis jirovecii pneumonia in systemic autoimmune rheumatic disease: a case-control study. *Semin Arthritis Rheum*. 2017; 46 (6): 804–809. doi: 10.1016/j.semarthrit.2016.09.009. Epub 2016 Sep 28.
24. Demoruelle M.K., Kahr A., Verilhac K. et al. Recent-onset systemic lupus erythematosus complicated by acute respiratory failure. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013; 65 (2): 314–323. doi: 10.1002/acr.21857.
25. Park J.W., Curtis J.R., Moon J. et al. Prophylactic effect of trimethoprim-sulfamethoxazole for pneumocystis pneumonia in patients with rheumatic diseases exposed to prolonged high-dose glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*. 2018; 77 (5): 644–649. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211796. Epub 2017 Nov 1.
26. Herrou J., De Lastours V. Predictive factors of pneumocystis pneumonia in patients with rheumatic diseases exposed to prolonged high-dose glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*. 2018; 79 (2): e23. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214718. Epub 2018 Nov 28.
27. Park J.W., Curtis J.R., Kim M.J. et al. Pneumocystis pneumonia in patients with rheumatic diseases receiving prolonged, non-high-dose steroids-clinical implication of primary prophylaxis using trimethoprim-sulfamethoxazole. *Arthritis Res Ther*. 2019; 21 (1): 207. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214718. Epub 2018 Nov 28.
28. Chan S.C.W., Chung H.Y., Lau C.S., Li P.H. Epidemiology, mortality and effectiveness of prophylaxis for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among rheumatic patients: a territory-wide study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021; 20 (1): 78. doi: 10.1186/s12941-021-00483-2.
29. Huang L., Fu, Q., Ye, Y. et al. High incidence and mortality of *Pneumocystis jirovecii* infection in anti-MDA5-antibody-positive dermatomyositis: experience from a single center. *Arthritis Res Ther*. 2021; 23 (1): 232. doi: 10.1186/s13075-021-02606-8.
30. Hsu H.C., Chang Y.S., Hou T.Y. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in autoimmune rheumatic diseases: a nationwide population-based study. *Clin Rheumatol*. 2021; 40 (9): 3755–3763. doi: 10.1007/s10067-021-05660-4. Epub 2021 Mar 1.
31. Zhao Z., Huang Y., Ming B. et al. Characterization and associated risk factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with AIRD: A retrospective study. *Rheumatology (Oxford)*. 2022; 61 (9): 3766–3776. doi: 10.1093/rheumatology/keab941.
32. Ishikawa Yu., Nakano K., Tokutsu K. et al. Estimation of treatment and prognostic factors of pneumocystis pneumonia in patients with connective tissue diseases. *RMD Open*. 2021; 7 (1): e001508. doi: 10.1136/rmdopen-2020-001508.
33. Kageyama T., Furuta S., Ikeda K. et al. Prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with systemic autoimmune diseases. *PLoS One*. 2019; 14 (3): e0214324. doi: 10.1371/journal.pone.0214324. eCollection 2019.
34. Sonomoto K., Tanaka H., Nguyen T.M. et al. Prophylaxis against pneumocystis pneumonia in rheumatoid arthritis patients treated with b/tsDMARDs: insights from 3787 cases in the FIRST registry. *Rheumatology*. 2022; 61 (5): 1831–1840. doi: 10.1093/rheumatology/keab647.
35. Komano Y., Harigai M., Koike R. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis Rheum*. 2009; 61 (3): 305–312. doi: 10.1002/art.24283.
36. US Food and Administration. Drug Safety update on TNF-alpha antagonists: infliximab and etanercept. https://wayback.archive-it.org/7993/20180127041103/https://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3779b2_01_cber_safety_revision2.htm. Accessed May 3, 2022.
37. Calero-Bernal M.L., Martin-Garrido I., Donazar-Ezcurra M. et al. Intermittent courses of corticosteroids also present a risk for pneumonia in non-HIV patients. *Can Respir J*. 2016; 2016: 2464791. doi: 10.1155/2016/2464791. Epub 2016 Sep 18.
38. Alexandre K., Ingen-Housz-Oro S., Versini M. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients treated with rituximab for systemic diseases: report of 11 cases and review of the literature. *Eur J Intern Med*. 2018; 50: e23–e24. doi: 10.1016/j.ejim.2017.11.014.
39. Park J.W., Curtis J.R., Jun K.I. et al. Primary prophylaxis for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients receiving rituximab. *Chest*. 2022 May; 161 (5): 1201–1210. doi: 10.1016/j.chest.2021.11.007. Epub 2021 Nov 14.
40. Schmajuk G., Jafri K., Evans M. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia (PJP) prophylaxis patterns among patients with rheumatic diseases receiving high-risk immunosuppressant drugs. *Semin Arthritis Rheum*. 2019; 48 (6): 1087–1092. doi: 10.1016/j.semarthrit.2018.10.018. Epub 2018 Nov 3.
41. Mori S., Cho I., Sugimoto M. A followup study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jirovecii* during Accepted Manuscript immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2009; 36: 1600–1605. doi: 10.3899/jrheum.081270. Epub 2009 Jun 16.
42. Nossent J., Keen H., Preen D., Inderjeeth C. Hospitalisation for tuberculosis and other opportunistic infections in patients with inflammatory joint diseases before and after the introduction of biological therapy. *Ann Rheum Dis*. 2022; 81 (Suppl 1): 182.
43. Nossent J., Keen H., Preen D., Inderjeeth C. Temporal trend in hospitalisation for opportunistic infections in patients with connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis*. 2022; 81 (Suppl 1): 661. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2022-eular.2552>
44. Grigoropoulos I., Thomas K., Christoforou P. et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia after initiation of tofacitinib therapy in rheumatoid arthritis: case-based review. *Mediterr J Rheumatol*. 2019; 30 (3): 167–170. doi: 10.31138/mjr.30.3.167. eCollection 2019 Sep.
45. Lourenço J., Carreira P. Non-lymphopenic pneumocystis pneumonia in low-dose methotrexate therapy: An exception to every rule. *Respir Med Case Rep*. 2020; 31: 101289. doi: 10.1016/j.rmcr.2020.101289. eCollection 2020.
46. Ohmura S.I., Homma Y., Masui T., Miyamoto T. Factors associated with pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate: a single-center retrospective study. *Intern Med*. 2022; 61 (7): 997–1006. doi: 10.2169/internalmedicine.8205-21. Epub 2021 Sep 11.
47. Nunokawa T., Yokogawa N., Shimada K., Sugii S. Effect of sulfasalazine use on the presence of *Pneumocystis* organisms in the lung among patients with rheumatoid arthritis: A test-negative design case-control study with PCR tests. *Mod Rheumatol*. 2019; 29 (3): 436–440. doi: 10.1080/14397595.2018.1465647. Epub 2018 May 3.
48. Honda N., Tagashira Y., Kawai S. et al. Reduction of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and bloodstream infections by trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in patients with rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol*. 2021; 50 (5): 365–371. doi: 10.1080/03009742.2020.1850854. Epub 2021 Mar 22.
49. Kimura M., Tanaka S., Ishikawa A. et al. Comparison of trimethoprim-sulfamethoxazole and aerosolized pentamidine for primary prophylaxis of pneumocystis jirovecii pneumonia in immunocompromised patients with connective tissue disease. *Rheumatol Int*. 2008; 28 (7): 673–676. doi: 10.1007/s00296-007-0505-4.
50. Kitazawa T., Seo K., Yoshino Y. et al. Efficacies of atovaquone, pentamidine, and trimethoprim/sulfamethoxazole for the prevention of pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with connective tissue diseases. *J Infect Chemother*. 2019; 25 (5): 351–354. doi: 10.1016/j.jiac.2019.01.005. Epub 2019 Jan 31.
51. Freeman C.D., Klutman N.E., Lamp K.C. et al. Relative Bioavailability of atovaquone suspension when administered with an enteral nutrition supplement. *Ann Pharmacother*. 1998; 32 (10): 1004–1007. doi: 10.1345/aph.17464.
52. Jinno S., Akashi K., Onishi A., Nose Y., Yamashita M., Saegusa J. Comparative effectiveness of trimethoprim-sulfamethoxazole versus atovaquone for the prophylaxis of pneumocystis pneumonia in patients with connective tissue diseases receiving prolonged high-dose glucocorticoids. *Rheumatol Int*. 2022 Aug; 42 (8): 1403–1409. doi: 10.1007/s00296-021-04945-w.
53. Hiramoto K., Akiyama M., Kaneko Y. Risk factors for adverse events of sulfamethoxazole-trimethoprim prophylaxis in patients with systemic rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2022; 81 (Suppl 1): 1055. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2022-eular.2215>
54. Utsunomiya M., Dobashi H., Odani T. et al. An open-label, randomized controlled trial of sulfamethoxazole-trimethoprim for *Pneumocystis*

- prophylaxis: results of 52-week follow-up. *Rheumatol Adv Pract.* 2020; 4 (2): rkaa029. doi: 10.1093/rap/rkaa029. eCollection 2020.
55. Harada T., Kato R., Sueda Y. *et al.* The efficacy and safety of reduced-dose sulfamethoxazole-trimethoprim for chemoprophylaxis of *Pneumocystis pneumonia* in patients with rheumatic diseases. *Mod Rheumatol.* 2021; 31 (3): 629–635. doi: 10.1080/14397595.2020.1812834. Epub 2020 Sep 9.
 56. Goyal N., Chung M., Bernheim A. *et al.* Computed tomography features of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review for radiologists. *J Thorac Imaging.* 2020; 35 (4): 211–218. doi: 10.1097/RTI.0000000000000527.
 57. Hochhegger B., Zanon M., Altmayer S. *et al.* COVID-19 mimics on chest CT: a pictorial review and radiologic guide. *Br J Radiol.* 2021; 94 (1118): 20200703. doi: 10.1259/bjr.20200703. Epub 2020 Dec 9.
 58. Bhatt K., Agolli A., Patel M.H. *et al.* High mortality co-infections of COVID-19 patients: mucormycosis and other fungal infections. *Discoveries (Craiova).* 2021; 9 (1): e126. doi: 10.15190/d.2021.5.
 59. Menon A.A., Berg D.D., Brea E.J. *et al.* A Case of COVID-19 and *Pneumocystis jirovecii* Coinfection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 202 (1): 136–138. doi: 10.1164/rccm.202003-0766LE.
 60. Gentile I., Viceconte G., Lanzardo A. *et al.* *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV patients recovering from COVID-19: a single-center experience. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 18 (21): 11399. doi: 10.3390/ijerph182111399.

Информация об авторах

Гриднева Галина Игоревна — к. м. н., научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-0928-3911. ResearcherID: AFN-9929-2022. eLIBRARY SPIN-код: 2849-5029. Scopus Author ID: 56381565500.

Белов Борис Сергеевич — д. м. н., заведующий лабораторией коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-7091-2054. Researcher ID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN-код: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

Аронова Евгения Сергеевна — к. м. н., научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1833-5357. Researcher ID: AAD-1849-2019. eLIBRARY SPIN-код: 8993-5795. Scopus Author ID: 55913403200

About the authors

Galina I. Gridneva — Ph. D. in Medicine, Researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention; V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-0928-3911. ResearcherID: AFN-9929-2022. eLIBRARY SPIN: 2849-5029. Scopus Author ID: 56381565500.

Boris S. Belov — D. Sc. in Medicine, Head of the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention; V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-7091-2054. Researcher ID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

Eugenia S. Aronova — Ph. D. in Medicine, Researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention; V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-1833-5357. Researcher ID: AAD-1849-2019. eLIBRARY SPIN: 8993-5795. Scopus Author ID: 55913403200

Памяти Б. Г. Андрюкова

In Memory of B. G. Andryukov

27 октября 2022 года на 69-м году ушёл из жизни доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, член Российской ассоциации научных редакторов и издателей, член-корреспондент РАЕН, Заслуженный врач РФ, кавалер орденов Почета и Ломоносова, обладатель 10 ведомственных медалей Андрюков Борис Георгиевич.

Андрюков Борис Георгиевич был высококвалифицированным специалистом в сфере клинической лабораторной диагностики и молекулярной микробиологии и эпидемиологии, главным специалистом Института по направлению, связанному с изучением адаптационных стратегий патогенных бактерий. Им опубликовано более 200 научных работ в российских и иностранных журналах, 8 монографий. Б. Г. Андрюков проводил большую образовательную и просветительскую работу, участвуя в научных конференциях, выставках и семинарах с докладами, лекциями в разных регионах Российской Федерации. Под руководством Бориса



Георгиевича активно проводились совместные научные исследования с ведущими научными институтами Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Дальневосточного федерального университета, НИИ молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (Москва), Политехническим университетом (Санкт-Петербург).

Борис Георгиевич был учёным высокого класса, прекрасным руководителем, умеющим воодушевлять людей новыми идеями. Его отличали неутомимая энергия, глубина знаний, стойкость духа. Чуткость и душевность, доброта и сердечность снискали уважение коллег, сослуживцев, друзей.

Светлая память о Борисе Георгиевиче Андрюкове навсегда сохранится в сердцах всех, знавших этого незаурядного человека!

Редколлегия, редакционный совет и редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия» выражает глубокое соболезнование родным и близким Бориса Георгиевича Андрюкова и вместе с ними скорбит о его безвременной кончине.

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

Редакция обращает внимание авторов на следующие правила и форму представления рукописей для публикации в журнале «Антибиотики и химиотерапия».

1. Статьи направляются по адресу: journalngsa@yandex.ru или размещаются ЧЕРЕЗ САЙТ журнала после регистрации в личном кабинете автора. Рукописи статей в 1 экз. направляются по адресу: **Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия», ул. Нагатинская, д. 3а, 117105.** Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами **с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон).**

2. В выходных данных статьи указываются: название статьи, инициалы, фамилии авторов, наименования учреждений всех авторов.

3. Статья печатается на одной стороне стандартного листа **через 1,5 интервала при ширине полей слева 3 см.**

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 100 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

5. Оригинальная статья должна включать (по порядку) следующие основные разделы: «**Резюме**» — не более 1 страницы; «**Введение**» с кратким обзором литературы и постановкой цели исследования; «**Материал и методы**» — с детальным описанием объектов исследований, методических приёмов и квалификаций использованных реагентов (фирм-изготовителей); «**Результаты исследований**» и «**Обсуждение результатов**» или «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**» или «**Выводы**» (по пунктам); «**Литература**» — с указанием цитируемых источников. В конце статьи приводятся «**Сведения об авторах**»: фамилия, имя и отчество полностью, учёная степень, звание, должность, место работы. Для автора, ответственного за переписку, указываются: почтовый адрес для корреспонденции, e-mail и телефон.

6. Таблицы должны быть пронумерованы, **иметь названия**, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте. Необщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть **сноски**.

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. В рукописи на обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. Для графиков и диаграмм отмечается, **что дано по осям координат** на приведённых кривых и т. п.

8. В **формулах** должны быть чётко **размечены все элементы**: строчные (м) и прописные (М) буквы, синим подчёркнуты латинские буквы, красным — греческие (с вынесением разметки на поля), чётко

выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, О — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

9. **Сокращения слов, названий** (кроме общепринятых сокращений мер физических, химических, а также математических величин и терминов) **не допускаются.** Меры даются по Международной системе единиц (СИ) в русском обозначении, температура по шкале Цельсия.

10. Латинские названия микроорганизмов приводятся в соответствии с современной классификацией. При первом упоминании название микроорганизма даётся полностью — род и вид (например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans*), при повторном упоминании **родовое название сокращается** до одной буквы (*E.coli*, *S.aureus*, *S.lividans*).

11. Названия генетических элементов даются в трёхбуквенном обозначении латинского алфавита строчными буквами, курсивом (tet), кодируемыми соответствующими генетическими элементами продукты — прописными прямыми буквами (TET).

12. В журнале используются **международные непатентованные названия** (МНН) препаратов. Торговые (патентованные) названия, под которыми препараты выпускаются различными фирмами, приводятся в разделе «Материал и методы», с указанием фирмы-изготовителя и их международным непатентованным названием.

13. **Цитируемые источники литературы** во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте статьи арабскими цифрами и заключаются в квадратные скобки. В пристатейном списке литературы каждый источник следует помещать с новой строки под порядковым номером. Количество цитируемых работ в оригинальных статьях и лекциях допускается до 40 источников, в обзорах — до 100 источников. В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Указываются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, издательство, год, количество страниц.

Недопустимо сокращать названия статей и названия отечественных журналов. Названия англоязычных журналов следует приводить в сокращении в соответствие с каталогом названий базы данных MedLine, если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название.

Оформление списка литературы должно удовлетворять требованиям РИНЦ и международных баз данных. В связи с этим, в ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице. То есть, библиографические описания ссылок на русскоязычные источники должны состоять из двух частей: русскоязычной и латиноязычной (подряд). При этом сначала следует приводить русскоязычную часть описания, затем — латиноязычную. Желательно вставлять Doi статьи.

Таким образом, если статья написана на латинице, то она должна быть процитирована в оригинальном виде:

Lang P.O., Michel J.P., Zekry D. Frailty syndrome: A transitional state in a dynamic process. Gerontology. 2009; 55 (5): 539–549.

Если статья написана на кириллице и у статьи есть официальный перевод названия, его нужно вставить в квадратных скобках после оригинального написания библиографической ссылки на источник. Если нет официального перевода, то нужно привести транслитерацию всей ссылки сразу после ссылки в оригинальном исполнении. В конце ссылки в квадратных скобках вставляется *in Russian*, без точки в конце:

Ткачева О.Н., Рунихина Н.К., Остапенко В.С. Валидация опросника для скрининга синдрома старче-

ской астении в амбулаторной практике. Успехи геронтологии. 2017; 30 (2): 236–242. [Tkacheva O.N., Runikhina N.K., Ostapenko V.S. Validacija oprosnika dlja skringa sindroma starcheskoj astenii v ambulatornoj praktike. Uspekhi Gerontologii 2017; 30 (2): 236–242. (in Russian)]

14. Статьи, ранее опубликованные или направленные в какой-либо другой журнал или сборник, не должны присылаться.

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

17. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

