МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Основан в 2008 году

Выпуск 11

Минск 2018

В сборнике представлены результаты исследований сотрудников РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, специалистов в области инфекционной патологии ряда ведущих научно-практических учреждений Республики Беларусь, стран СНГ и дальнего зарубежья. публикациях отражены актуальные вопросы эпидемиологического надзора молекулярной эпидемиологии, молекулярно-И проблем генетичеких клеточных механизмов патогенеза. современных иммунопрофилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний.

Сборник предназначен для научных сотрудников и работников практических учреждений системы здравоохранения.

The collection contains the research results obtained by specialists of the Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, by experts in the field of infectious pathology from leading research medical institutions of the Republic of Belarus, the CIS and abroad. Topical issues of epidemiological surveillance and molecular epidemiology, molecular genetic and cellular mechanisms of pathogenesis, contemporary issues for immunization, diagnosis and treatment of infectious diseases are reflected in the papers.

The book is intended for researchers and specialists in public health.

Редакционная коллегия:

Л.П. Титов, чл.-кор НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. (гл. ред.)
Т.В. Амвросьева, д-р мед. наук, проф. (зам. гл. ред.),
Е.И. Бореко, д-р мед. наук, доц. (зам. гл. ред.),
В.А. Горбунов, канд. мед. наук, доц., Н.Н. Полещук, д-р мед. наук, проф., Т.И. Самойлова, д-р биол. наук, проф., Г.О. Самойлович, д-р мед. наук, проф., Г.Н. Чистенко, д-р мед. наук, проф.

Редакционный совет:

А.Н. Алексеев, д-р мед. наук, проф. (Россия), Л. ДуБуски, проф. (США), Н.А. Виноград, д-р мед. наук, проф. (Украина), С.В. Жаворонок, д-р мед. наук, проф. (Беларусь), И.А. Карпов, д-р мед. наук, проф. (Беларусь), А.Ю. Миронов, д-р мед. наук, проф. (Россия), М. Муровска, д-р мед. наук, проф. (Латвия), Н.В. Рудаков, д-р мед. наук, проф. (Россия), В.М. Семенов, д-р мед. наук, проф. (Беларусь), Дж. Сильва, проф. (США), А.В. Сукало, акад. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. (Беларусь), Д. Феби, проф. (Великобритания), В.М. Цыркунов, д-р мед. наук, проф. (Беларусь)

Рецензенты:

чл.-корр. НАН Беларуси, д-р биол. наук Э.*И. Коломиец* д-р мед. наук, профессор *Н.Д. Коломиец*

© Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», 2018

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Обзорные сообщения

РЕАЛИЗАЦИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

А.Л. Лешкевич, Л.А. Морозик, Т.В. Бурдейная, В.В. Пашкович ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Беларусь

Резюме. В кратком обзоре представлена информация об организации и функционировании государственной системы санитарной охраны территории Республики Беларусь от завоза и распространения инфекционных и массовых неинфекционных заболеваний. Приведены основные законодательные и нормативные акты по реализации мероприятий данной системы, базирующиеся на основных принципах Международных медико-санитарных правил (2005 г.) с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Республика Беларусь выполняет свои обязательства по санитарной охране территории, результатом чего является отсутствие за последние годы в стране случаев завоза и распространения заболеваний, представляющих чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, имеющую международное значение.

Ключевые слова: санитарная охрана территории, Республика Беларусь, эпидемиологический надзор, законодательная база.

Санитарная охрана территории от завоза и распространения инфекционных и массовых неинфекционных заболеваний – одна из основных задач в рамках обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Республика Беларусь, как и все мировое сообщество, своевременно реагирует на эпидемиологическое неблагополучие в мире по инфекционным заболеваниям, представляющим чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, имеющую международное значение, в рамках комплекса мероприятий по санитарной охране территории, определенного Законом Республики Беларусь «О санитарноэпидемиологическом благополучии населения» (далее — Закон) и базирующегося на основных принципах, определенных Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) (далее — ММСП).

В соответствии со статьей 23 Закона санитарная охрана территории Республики Беларусь обеспечивается путем:

осуществления санитарно-карантинного контроля;

проведения комплекса административных, санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения инфекционных и массовых неинфекционных заболеваний, их локализацию и ликвидацию;

обеспечения постоянной готовности государственных органов, организаций здравоохранения и иных организаций к проведению комплекса административных, санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию очагов инфекционных заболеваний;

проведения мониторинга возбудителей инфекционных заболеваний;

введения (отмены) ограничительных мероприятий;

осуществления международного сотрудничества в области санитарной охраны территорий.

В целях предотвращения заноса и распространения инфекционных заболеваний, представляющих чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, имеющую международное значение (далее – Заболевания), на территории Республики Беларусь проводится работа по укреплению национальной безопасности в сфере санитарной охраны территории со стороны Министерства здравоохранения Республики Беларусь совместно с иными заинтересованными министерствами и ведомствами. В функционирует государственная Республике Беларусь создана И предупреждения и ликвидации чрезвычайных ситуаций, положение, структура и основные направления деятельности всех участников которой утверждены Советом Министров Республики Беларусь. С целью координации работы по предотвращению международного распространения Заболеваний через транспорт, миграцию и торговлю созданы каналы коммуникаций между Министерством здравоохранения Республики Беларусь, являющегося национальным координатором по ММСП в стране, с Государственным пограничным комитетом, Государственным таможенным комитетом, Министерством сельского хозяйства и продовольствия, Министерством спорта и туризма и др. по реагированию на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения.

Для обеспечения комплекса лечебно-диагностических и санитарнопротивоэпидемических мероприятий при чрезвычайных ситуациях созданы специализированные формирования службы экстренной медицинской помощи и специализированные формирования государственного санитарного надзора.

Специализированные формирования государственного санитарного надзора являются нештатными формированиями быстрого реагирования, которые предназначены для: организации и осуществления контроля за обеспечением санитарно-эпидемиологического благополучия населения в республике; прогнозирования и оценки эпидемиологической обстановки в районах чрезвычайных ситуаций; организации и проведения санитарно-противоэпидемических мероприятий по предупреждению, локализации и ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций мирного и военного времени.

Особое внимание уделяется осуществлению санитарно-карантинного контроля (далее – СКК) лиц, транспортных средств, подконтрольных товаров, прибывающих на территорию Республики Беларусь, в том числе из стран, неблагополучных по Заболеваниям. На государственном уровне для этих целей определено 36 пунктов пропуска на Государственной границе Республики Беларусь, оборудованных в соответствии с требованиями нормативных правовых актов Республики Беларусь и документами ЕАЭС.

В 2017 г. количество лиц, охваченных СКК, составило 12 126 778 человек, всего было выявлено 28 человек с симптомами, не исключающими инфекционные заболевания, для проведения лечебно-диагностических мероприятий в организации здравоохранения госпитализированы 10 человек. Инфекционных заболеваний, представляющих чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, имеющую международное значение, не зарегистрировано.

Министром здравоохранения Республики Беларусь утвержден и выполняется План мероприятий по реализации Указа Президента Республики Беларусь от 9 января 2017 г. № 8 «Об установлении безвизового порядка въезда и выезда иностранных граждан».

Ежегодно на всех административных территориях специалистами органов государственного санитарного надзора всех уровней проводится оценка готовности организаций здравоохранения, в том числе в сельских населенных пунктах, к раннему выявлению лиц с симптомами Заболеваний, оказанию им медицинской помощи и проведению соответствующих санитарно-противоэпидемических мероприятий.

В регионах ежегодно проводятся показательные учения по локализации и ликвидации чрезвычайных ситуаций, связанных с выявлением лиц с симптомами, не исключающими Заболевания. В 2017 г. проведены республиканские показательные учения: по локализации и ликвидации очага болезни, вызванной вирусом Эбола, в Дзержинском районе Минской области, а также в рамках сотрудничества по предотвращению и контролю событий в области общественного здравоохранения в гражданской авиации (CAPSCA) на базе РУП «Национальный аэропорт «Минск». В 2018 г. проведены республиканские показательные учения по локализации и ликвидации Заболевания с аэрогенным механизмом передачи инфекции (лихорадка Ласса) в г. Брест. Экспертами, присутствующими на данных мероприятиях, была дана высокая оценка уровня их подготовки, отмечено четкое взаимодействие всех задействованных специалистов как органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, и организаций здравоохранения, так и представителей немедицинских служб.

Разработаны и утверждены Алгоритм действий специалистов санитарноэпидемиологических учреждений по реагированию на возникновение угроз инфекционной и неинфекционной природы в сопредельных странах, Алгоритм действий при выявлении лиц с симптомами, не исключающими инфекционные заболевания, имеющие международное значение и требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории.

С целью повышения информированности по вопросам профилактики Заболеваний проводится планомерная работа с представителями организаций и учреждений сферы туристических услуг, организаций, осуществляющих международные перевозки, работников гостиниц, общежитий, учреждений образования.

Информация об эпидситуации в мире по Заболеваниям регулярно размещается на интернет-сайтах Министерства здравоохранения Республики Беларусь, а также органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор. Специалисты Министерства здравоохранения и подчиненных ему организаций поддерживают постоянную связь со СМИ для проведения информационно-разъяснительной работы с населением.

Таким образом, Республика Беларусь выполняет свои обязательства по санитарной охране территории, результатом чего является отсутствие за последние годы в стране случаев завоза и распространения Заболеваний, а также иных чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение.

IMPLEMENTATION OF MEASURES FOR SANITARY PROTECTION IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

A.L. Leshkevich, L.A. Morozik, T.V. Budreinaya, V.V. Pashkovich

Republican Centre for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

The brief review provides information on the organization and functioning of the state system of sanitary protection of the territory of the Republic of Belarus against the importation and spread of infectious and mass non-communicable diseases. The main legislative and regulatory acts on the system measures implementation, based on the basic principles of the International Health Regulations (2005) to ensure the sanitary and epidemiological well-being of the population. The Republic of Belarus fulfills its obligations under the sanitary protection of the territory, resulting in the absence of importation cases and spread of diseases to be a Public Health Emergency of International Concern in the country in recent years.

Keywords: sanitary protection of the territory, the Republic of Belarus, epidemiological surveillance, legislative framework.

Поступила 08.11.2018

Оригинальные исследования

ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВИРУСНЫМ ГАСТРОЭНТЕРИТОМ В ЗАКРЫТЫХ КОЛЛЕКТИВАХ

Т.В. Амвросьева¹, Н.В. Поклонская¹, С.К. Лозюк¹, П.И. Пилат², И.А. Рыбин²

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»;

²ГУ «23 санитарно-эпидемиологический центр Вооруженных Сил Республики
Беларусь», Минск, Беларусь

Резюме. Норовирусы являются доминирующим возбудителем групповой заболеваемости острым гастроэнтеритом вирусной этиологии во всем мире. За период с 2009 г. зарегистрировано 33 эпизода групповой заболеваемости на территории Республики Беларусь, 24 из них имели место в закрытых коллективах. Норовирусы были основным этиологическим агентом групповой заболеваемости как в целом, так и в закрытых коллективах (75% и 82,5% эпизодов, соответственно). Групповая заболеваемость в закрытых коллективах не имела выраженной сезонности и чаще регистрировалась у взрослых. Для 25% эпизодов на основании результатов молекулярно-эпидемиологического расследования установлена связь групповой заболеваемости норовирусной инфекцией в закрытом коллективе и бессимптомного или постсимптомного вирусоносительства у работников пищеблоков.

Ключевые слова: норовирус, гастроэнтерит, групповая заболеваемость, Беларусь.

Введение. Вспышки кишечных инфекций вирусной этиологии являются серьезной проблемой для закрытых и полузакрытых коллективов во всем мире. Круизные лайнеры, интернаты и, особенно, военные части достаточно часто связывают причиной которого может с возникновением острого гастроэнтерита, бактериальное, вирусное или паразитарное заражение [1]. Так, в 2012 г. за медицинской помощью обращались 15 000 военнослужащих с диареями, проходящих действующую службу в вооруженных силах США [2]. Лагерный образ жизни, при котором люди живут в закрытом сообществе и вынуждены тесно взаимодействовать в быту, используя одни и те же комнаты для приема пищи, санитарные помещения и т.д., особенно подвержены риску групповой заболеваемости острым гастроэнтеритом норовирусной этиологии. Известны случаи групповой заболеваемости норовирусной инфекцией как среди морских, так и сухопутных войск, а также в военных учебных заведениях США, Израиля, Великобритании, Австралии, Германии, Франции и Португалии [3]. Кроме того, было установлено, что норовирус являлся наиболее распространенной причиной гастроэнтерита морских пехотинцев США во время операции в Ираке [2].

В Республике Беларусь норовирусы – одни из доминирующих агентов острых кишечных инфекций (ОКИ), на долю которых приходится 27% случаев ОКИ. За период наблюдений (2009-2019 гг.) было зафиксировано также значительное количество эпизодов групповой заболеваемости норовирусной инфекцией. В связи с тем, что в отношении норовирусной инфекции отсутствуют специфические средства лечения и средством, профилактики, единственным позволяющим предотвратить мониторинг, распространение, эпидемиологический является основанный результатах лабораторного контроля и включающий молекулярные исследований.

Целью представленной работы был анализ данных, полученных при молекулярно-эпидемиологическом расследовании групповой заболеваемости в закрытых и полузакрытых коллективах на территории Республики Беларусь в период 2009-2018 гг.

Материалы и методы. Были исследованы 483 пробы стула, из них 300 были получены от пациентов с симптомами вирусного острого гастроэнтерита (ОГЭ) при расследовании групповой заболеваемости и 183 — от работников пищеблоков и мест общественного питания. Пробы исследовались на норовирус 1 и 2 группы, саповирус, энтеровирус, ротавирус, аденовирус F, астровирус, кампилобактер (*Campylobacter*), сальмонеллу (*Salmonella*) и шигеллу (*Shigella*) с целью установления этиологии заболевания и идентификации возможного источника заражения, а также путей и факторов передачи инфекции.

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из проб применяли коммерческие наборы «Рибо-преп» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями по применению. Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор «Риверта-L» («АмплиСенс», Россия), также следуя рекомендациям изготовителя.

Наличие вируса в пробе определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием тест-систем для выявления норовирусов методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции «НоВ-ПЦР» («РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», Беларусь) и «ОКИ-скрин» («Амплисенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGene 6000 («Corbett Life Sciences», Австралия).

Для накопления фрагментов генома вируса с целью секвенирования использовали Fusion ДНК полимеразу, 2,5х реакционный буфер «НF» содержащий 0,5 мМ смесь дезоксинуклеотидов и 5 мМ раствор MgCl2 («АртБиоТех», Беларусь). Амплификацию осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров и зондов (PrimeTech, Беларусь) [4].

Реакцию секвенирования производили с помощью набора «GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman coulter, США). Детекцию результатов осуществляли на приборе CEQ 8 000 (Beckman coulter, США), анализ результатов – в MEGA6 [5].

Молекулярное типирование проводили с помощью программных продуктов «BLAST» и «Norovirus Genotyping Tool Version 1.0», доступных для свободного использования в режиме онлайн [6, 7].

Результаты и обсуждение. В ходе молекулярно-эпидемиологического мониторинга кишечных вирусных инфекций, который ведется на территории Беларуси с 2009 г., было зарегистрировано 33 эпизода групповой заболеваемости, в том числе 24 – в закрытых коллективах.

Анализ групповой заболеваемости в целом показал, что в нее были вовлечены как взрослые пациенты (63,6%), так и дети (36,4%). При этом наибольшее количество эпизодов приходилось на долю норовирусов 2 геногруппы (66%), еще 9% было вызвано норовирусом 1 геногруппы, с саповирусом и ротавирусом было связано по 6% эпизодов, а 3% были обусловлены энтеровирусом. Для 9% эпизодов этиологический агент установить не удалось. Распределение групповой заболеваемости по годам представлено на рисунке 1. Из рисунка видно, что наибольшее число эпизодов наблюдалось в 2012 и 2015 гг. (по 18% от общего количества). В 2012 г. также было выявлено наибольшее разнообразие этиологических агентов групповой заболеваемости. Наименьшее число эпизодов групповой заболеваемости было зарегистрировано в 2009, 2011 и 2014 гг.

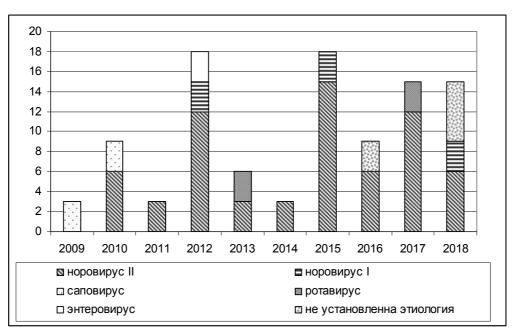


Рисунок 1. – Групповая заболеваемость в период 2009-2018 гг.

Полученные результаты указывают на то, что норовирусы являются безусловным лидером среди вирусных возбудителей групповой заболеваемости ОГЭ на территории Республики Беларусь: за период 2009-2018 гг. было зарегистрировано 24 эпизода групповой заболеваемости связанных с норовирусами, что составило 72,7% от общего количества проанализированных эпизодов. Аналогичная ситуация наблюдается и в мировом масштабе. Так, данные Центра по контролю над заболеваемостью (СDС), США, свидетельствуют о том, что норовирусы являются причиной 90% вспышек вирусной природы и 50% эпизодов групповой заболеваемости, связанной с пищей. Такие же данные получены и в странах Западной Европы, где в период 2001-2006 гг. было зарегистрировано 7 637 вспышек, вызванных норовирусами. При этом, в таких развитых странах как Германия и Англия частота групповой заболеваемости норовирус-ассоциированным гастроэнтеритом была выше по сравнению с другими европейскими странами [8].

Частота групповых эпизодов норовирусной инфекции в различное время года представлена на рисунке 2. Можно отметить, что у групповой заболеваемости на территории Беларуси не было ярко выраженной сезонности. Однако, больший процент эпизодов приходился на июль, сентябрь и октябрь (14,3%) и несколько меньше на май (11,4%).

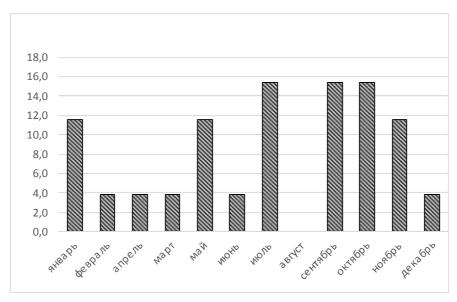


Рисунок 2. – Распределение частоты эпизодов групповой заболеваемости в соответствии с сезонами года

Согласно литературным данным для спорадической заболеваемости норовирусной инфекцией характерен подъем заболеваемости с осени по весну, с пиком в зимние месяцы, но для вспышек не выделяют определенной сезонности, что наблюдалось и при анализе данных, полученных для Беларуси. На основании полученных результатов нельзя говорить о четкой связи между заболеваемостью и сезонами года, стоит лишь отметить подъем заболеваемости в осенние месяцы, что согласуется с данными полученными в США, по которым шансы возникновения вспышек с ноября по апрель были в 1,5 раза выше, чем в другое время года [9].

В закрытых и полузакрытых коллективах зарегистрировано 24 эпизода групповой заболеваемости из 33, причем наибольшее их количество имело место в те же годы, когда наблюдалось максимальное количество эпизодов групповой заболеваемости в целом: в 2012 (16,7%), 2015 (20,7%) и 2017 гг. (16,5%) (рисунок 3).

Доминирующим возбудителем групповой заболеваемости в закрытых и полузакрытых коллективах также были норовирусы 2 геногруппы - 74,5% (n=18), значительно реже регистрировалась групповая заболеваемость другой этиологии: 2 эпизода саповирусного ОГЭ, 2 – ротавирусного ОГЭ, 2 эпизода было вызвано норовирусами 1 геногруппы.

Сезонность групповой заболеваемости норовирусной инфекцией в закрытых коллективах совпадала с распределением, представленным на рисунке 2.

По возрастной структуре 79,2 % (n=19) эпизодов групповой заболеваемости приходилось на взрослых (старше 18 лет) и 20,8% (n=5) регистрировалось среди детей и подростков. Эти результаты подтверждают данные о том, что норовирусы являются доминирующим возбудителем вирусных гастроэнтеритов среди взрослых, особенно лиц пожилого возраста, находящихся в закрытых учреждениях вроде домов престарелых или госпиталей.

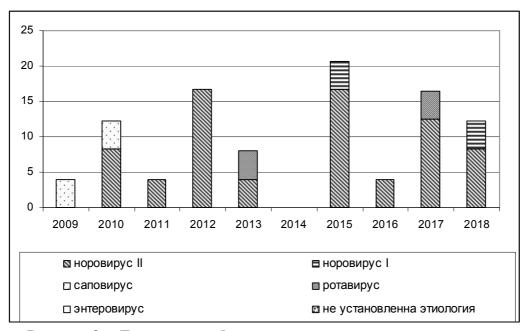


Рисунок 3. – Групповая заболеваемость в закрытых коллективах в период 2009-2018 гг.

Для 7 эпизодов, имевших место в закрытых коллективах, на основании результатов эпидемиологического расследования, предполагался пищевой путь передачи в результате контаминации продуктов питания в процессе приготовления пищи. В связи с этим у работников общественного питания были взяты образцы для выявления возможного источника вирусной контаминации продуктов. Пробы отбирались у лиц, которые с наибольшей вероятностью могли контактировать с пищей. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Результаты исследований клинического материала работников мест общественного питания и пищеблоков в закрытых коллективах, где произошли эпизоды групповой заболеваемости

Дата и регион регистрации эпизода	работники общественного		инфицированные		этиологический агент
групповой	·	ания			W1 4111
заболеваемости	кол-во	%	кол-во	%	
	исслед.	полож.	исслед.	полож.	
Октябрь, 2015	5	20%	10	90%	Норовирус II
Октябрь, 2015	19	52%	12	100%	Норовирус І
Ноябрь, 2016	43	9%	16	100%	Норовирус II
Март, 2017	19	0%	11	100%	Ротавирус
Май, 2017	14	36%	11	100%	Норовирус II
Ноябрь, 2017	12	33%	8	100%	Норовирус II
Ноябрь, 2017	2	100%	5	100%	Норовирус II

Из представленных в таблице 1 данных видно, что только в одном случае работники пищеблока не были инфицированы (эпизод групповой заболеваемости в марте 2017 г., этиологический агент – ротавирус), тогда как во всех остальных случаях у работников, вовлеченных в процесс приготовления пищи, были выявлены вирусы, которые являлись этиологическими агентами групповой заболеваемости – норовирусы

1 и 2 геногрупп. В связи с высокой генетической вариабельностью этих вирусов и постоянной циркуляцией значительного количества различных генотипов и геновариантов, идентификация норовируса без его молекулярного типирования не является достаточным основанием для заключения о наличии эпидемиологической связи между отдельными случаями заболевания. Выявленные у работников пищеблоков вирусы могли принадлежать другим генотипам, а их носительство могло не быть связано с возникновением групповой заболеваемости в закрытом, или полузакрытом коллективе. Поэтому на следующем этапе исследований было проведено молекулярное типирование норовирусов, обнаруженных у пострадавших и у работников пищеблоков.

Для всех выявляемых в ходе исследования норовирусов проводили молекулярногенетический анализ по 2 регионам генома – фрагментам генов VP1, кодирующего основной капсидный белок, и RdRp, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса. Результаты молекулярно-генетического типирования норовирусов, вызывавших групповую и спорадическую заболеваемость в соответствии с годами их выявления представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Результаты сравнения генотипов норовирусов, выявленных у работников мест общественного питания и у пациентов в закрытых коллективах, где произошли эпизоды групповой заболеваемости

Дата и регион регистрации	Генотип,	Генотип
эпизода групповой	идентифицированный у	идентифицированный у
заболеваемости	пациентов	работников пищеблока
Октябрь, 2015	GII.17	GII.17
Октябрь, 2015	GI.3	GI.3
Ноябрь, 2016	GII.16/GII.2	GII.16/GII.2
Май, 2017	GII.17	GII.17
Ноябрь, 2017	GII.16/GII.4	GII.16/GII.4
Ноябрь, 2017	GII.16/GII.3	GII.16/GII.3

Из таблицы 2 видно, что во всех случаях, когда у работников пищеблока обнаруживался вирусный агент того же типа, который вызвал групповую заболеваемость, его генотип совпадал с генотипом вируса, обнаруженного у пациентов. Эти данные позволили подтвердить роль работников пищеблока, как источника вирусной контаминации пищевых продуктов, которые были причиной возникновения групповой заболеваемости. Следует отметить, что все работники пищеблоков, в пробах которых были выявлены вирусы, не имели клинических симптомов ОГЭ, а также других жалоб на состояние здоровья. Этот факт позволяет предположить, что у данной категории имело место либо бессимптомное вирусоносительство, либо они выделяли вирус после ранее перенесенного заболевания (постсимптомное носительство). Вероятность бессимптомного носительства норовирусов достаточно высока: по данным СDС около 30% случаев норовирусной инфекции не сопровождается выраженными клиническими проявлениями.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствовали о связи групповой заболеваемости в закрытых коллективах с носительством этиологического агента работниками общественного питания. Для 25% эпизодов групповой заболеваемости в закрытом коллективе было достоверно установлено, что норовирусы, вызвавшие заболевание, обнаруживались также у работников пищеблоков этих закрытых коллективов. Поскольку вышеуказанные лица непосредственно были вовлечены в процесс приготовления пищи, их роль, как источника вирусной контаминации

продуктов питания, представляется весьма вероятной. Представленные данные о роли носителей-работников бессимптомных (или постсимптомных) пищеблоков возникновении групповой заболеваемости в закрытых коллективах согласуются с результатами, полученными в других странах. Так, при анализе вспышек норовирусной инфекции в Миннесоте в 1981-1998 гг., роль бессимптомных вирусоносителей из числа работников пищевой отросли была установлена для 21 (18% зарегистрированных) эпизода групповой заболеваемости, связанного с пищевым путем передачи. Молекулярно-биологические исследования, проведенные в Дании в 2005-2011 гг., показали связь между возникновением групповой заболеваемости и бессимптомным (постсимптомным) носительством для 47% вспышек норовирусной инфекции. Нельзя утверждать наверняка, каким образом произошла вирусная контаминация пищи в исследуемых эпизодах - непосредственно от вирусоносителей, или через третьих лиц, которые механически перенесли вирус после контакта с вирусоносителем. Однако распространение вируса можно было бы предотвратить, соблюдая тщательную гигиену в процессе приготовления пищи.

Заключение. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о доминировании норовирусов, как возбудителя групповой заболеваемости в целом (75%), а также в закрытых коллективах (82,5%). При этом групповая заболеваемость норовирусным гастроэнтеритом в закрытых коллективах среди взрослых была почти в 4 раза выше, чем среди детей. В то время как для спорадической норовирусной инфекции характерна осенне-зимняя сезонность, в случае групповой заболеваемости, сезонность значительно менее выражена.

работе представлены результаты молекулярно-эпидемиологических исследований, которые указывают на бессимптомное вирусоносительство работников общественного питания, как важный фактор возникновения групповой заболеваемости норовирусной инфекцией в закрытых коллективах. При расследовании 25% эпизодов групповой заболеваемости у 9-100% обследованных работников пищеблока был обнаружен генотип вируса, вызвавший данный эпизод. Анализ литературы свидетельствует о том, что аналогичные результаты были получены в странах Западной Европы, США и Азии. Учитывая высокую вероятность бессимптомного течения норовирусной инфекции, представляется целесообразным при регистрации групповой заболеваемости в закрытом коллективе проводить лабораторную диагностику как заболевших, так и работников общественного питания. Своевременное выявление бессимптомных вирусоносителей и временное отстранение их от участия в приготовлении пищи будет способствовать прекращению распространения инфекции. Помимо этого, полученные результаты указывают на необходимость проведения регулярных инструктажей по соблюдению гигиенических норм в процессе приготовления пищи.

Литература

- 1. Sources of Calicivirus contamination in foodborne outbreaks in Denmark, 2005-2011 the role of the asymptomatic food handler / K.T. Franck [et al.] / J. Infect. Dis. -2015 Vol. 211. P. 563-570.
- 2. Viral gastroenteritis associated with genogroup II norovirus among U.S. military personnel in Turkey, 2009 / S.F. Ahmed [et al.] // PLoS One. 2012. Vol. 7, N 5. e35791. doi:10.1371/journal.pone.0035791.
- 3. Acute gastroenteritis outbreak associated to norovirus GI.9 in a Portuguese army base / A. Lopes-Joao [et al.] // J. Med. Virol. 2016. Vol. 89, N 5. P. 922-925. doi:10.1002/jmv.24704.
- 4. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses / S. Kojima [et al.] / J. Virol. Methods -2002 Vol. 100. P. 107-114.

- 5. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / T. Koichiro [et al.] // Molec. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725-2729.
- 6. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215. P. 403-410.
- 7. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses / A. Kroneman [et al.] // J. Clin. Virol. 2011. Vol. 51, N 2. P. 121-125.
- 8. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006 / A. Kroneman [et al.] // J. Clin. Microbiol. -2008. Vol. 46, N 9. P. 2959-2965.
- 9. The norovirus epidemiologic triad: predictors of severe outcomes in US norovirus outbreaks, 2009-2016 / R.M. Burke [et al.] // J. Infect. Dis. 2018. jiy569. doi: 10.1093/infdis/jiy569.

PECULARITIES OF VIRAL GASTROENTERITIS GROUP MORBIDITY IN SEMI-CLOSED COMMUNITIES

T.V. Amvrosieva¹, N.V. Paklonskaya¹, S.K. Laziuk¹, P.I. Pilat², I.A. Rybin²

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

²23rd Sanitary-Epidemiological Center of the Armed Forces of the Republic of Belarus,

Minsk, Belarus

Noroviruses are the predominant agents of acute viral gastroenteritis outbreaks around the world. Since 2009, 33 episodes of group morbidity had registered in the Republic of Belarus, 24 of which took place in semi-closed communities. Noroviruses were the leading etiological agents of group morbidity in general, and prevailed among patients in semi-closed communities (75% and 82.5% of episodes, respectively). Group morbidity in semi-closed community did not have an obvious seasonality and had registered mainly among adults. Based on the molecular epidemiology results, in 25% of episodes there were epidemiological link between morbidity in patients and asymptomatic or postsymptomatic virus holders among food service workers.

Keywords: norovirus, gastroenteritis, group morbidity, Belarus.

Поступила 29.11.2018

ПРИВИВОЧНЫЙ СТАТУС И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ У РАБОТНИКОВ ОРГАНИЗАЦИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2016-2017 гг.

А.Н. Волченко¹, В.М. Мицура², В.В. Запольская³, Д.В. Терешков², В.С. Высоцкая³, В.В. Пашкович³, И.Н. Глинская³

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск; УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель; ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Беларусь

Резюме. За 2016-2017 гг. в Республике Беларусь было зарегистрировано 280 случаев парентеральных вирусных гепатитов (ПВГ) у работников организаций здравоохранения. Не имели сведений о профилактических прививках в медицинской документации или не привиты 58,9%, получили полный курс вакцинации 37,1% человек, неполный курс вакцинации -3,9% работников. Среди зарегистрированных случаев ПВГ вирусный гепатит С составил 72%, вирусный гепатит В -28%. Среди работников организаций здравоохранения с выявленным впервые вирусным гепатитом В 79,7% были не привиты, 1,3% получили не полный курс вакцинации, а 19,0% были вакцинированы по схеме. При изучении фактического уровня иммунитета среди 136 вакцинированных (полностью и частично) медицинских работника - у 60 (44,1%) титры антител были ниже защитного уровня.

Ключевые слова: парентеральные вирусные гепатиты, вирусный гепатит В и С, вакцинация, медицинские работники, Республика Беларусь.

Введение. Парентеральные вирусные гепатиты (ПВГ) вызываются в основном вирусами гепатитов С, В и D. Они широко распространены во всем мире, частота их распространения колеблется от 1% до 15% в общей популяции. Особую группу риска представляют работники организаций здравоохранения, так как их работа связана с оказанием медицинской помощи, в том числе с повреждением кожных покровов, инфицированным пациентам. Контакт с кожей и слизистыми оболочками пациентов, микроповреждений кожи, пренебрежение мерами индивидуальной профилактики и использованием средств индивидуальной защиты повышает риски инфицирования медицинского работника от пациента. Факторами риска заражения вирусами гепатитов также являются длительный стаж работы; принадлежность к определенной профессиональной группе (инфицированность медицинских сестер в 1,5-2 раза выше, чем врачей), наличие иммунодефицитных состояний, связанных с возрастом, сопутствующими заболеваниями [1]. Частота выявления маркеров вирусных гепатитов С и В (ВГС и ВГВ) у медицинских работников превышает таковую в общей 3]. Однако медицинские работники ΜΟΓΥΤ инфицироваться парентеральными инфекциями и другими путями, не связанными с профессиональной деятельностью [4]. О чем может свидетельствовать еще и одинаковое соотношение выявляемых форм ВГС и ВГВ (4,9:1 для всего населения Республики Беларусь и 4,8:1 для медицинских работников), отражающее влияние сходных факторов на проявления эпидемического процесса среди населения, так и среди медицинских работников [5]. В Республике Беларусь в 2010-2014 гг. заболеваемость ПВГ среди медицинских работников была в 2,1 раза выше заболеваемости среди всего населения республики (14,2 случая на 10 000 медицинских работников и 68,8 случаев на 100 000 всего населения) [5]. Эпидемиологическую ситуацию по заболеваемости всеми формами ПВГ медицинских работников в Республике Беларусь можно оценить, как благополучную с выраженной тенденцией к снижению в 2010-2014 гг. (ежегодно на 12,4%). Снижение заболеваемости происходит за счет снижения выявления носителей маркеров ПВГ (на 26,1% ежегодно), при росте заболеваемости острыми (на 10,2% ежегодно) и хроническими формами (на 5,3% ежегодно) [5].

Возникает необходимость в оценке эффективности вакцинации против ВГВ у работников организаций здравоохранения и ее влиянии на заболеваемость ВГВ.

Цель исследования: оценить распространенность парентеральных вирусных гепатитов у работников организаций здравоохранения Республики Беларусь в 2016-2017 гг. и их прививочный статус против ВГВ.

Материалы и методы. Для анализа распространенности ПВГ и прививочного статуса инфицированных медицинских работников были собраны и обработаны данные карт эпидемического расследования случаев, внесенных в автоматизированную информационную систему «Эпидемиология» (ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья») в 2016-2017 гг.

Для оценки фактического уровня иммунологической защиты было обследовано на наличие антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (анти-HBsAg) 214 медицинских работников УЗ «Гомельская областная инфекционная клиническая больница» (врачи, средний и младший медицинский персонал, персонал отделения лабораторной диагностики). Исследование проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем производства Вектор-Бест (Россия), защитным считался уровень анти-HBs 10 мМЕ/мл и более.

Результаты и их обсуждение. За 2016-2017 гг. в Республике Беларусь было зарегистрировано 280 случаев ПВГ у работников организаций здравоохранения, 169 случаев в 2016 г. и 111 – в 2017 г. Среди заболевших преобладали женщины – 92%. Врачи составили 14,3% от всех случаев, зарегистрированных у работников организаций здравоохранения суммарно за 2 года наблюдения; 40,7% — средний медицинский персонал и 45% — младший медицинский персонал, включая сотрудников организаций здравоохранения без медицинского образования (психологи, массажисты, няни, буфетчицы, раздатчицы, сантехники). Распределение инфицированных (абсолютное число зарегистрированных случаев) по административным территориям Республики Беларусь представлено на рисунке. Каждый пятый инфицированный ПВГ работник организации здравоохранения работает в г. Минске.

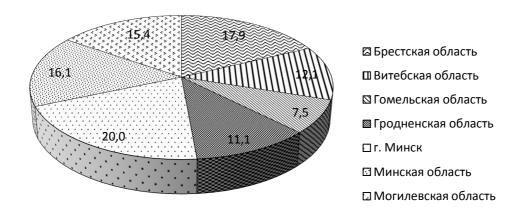


Рисунок — Распределение долей инфицированных ПВГ работников организаций здравоохранения по административным территориям Республики Беларусь (суммарно за 2016-2017 годы)

При изучении прививочного статуса инфицированных ПВГ работников организаций здравоохранения получены следующие данные: не имели сведений о профилактических прививках в медицинской документации или не привиты -165 человек (58,9%), получили полный курс вакцинации (3 дозы) -104 человека (37,1%), неполный курс вакцинации (1 или 2 дозы) -11 человек (3,9%).

Среди зарегистрированных случаев ПВГ преобладал вирусный гепатит С (72%), на долю вирусного гепатита В приходилось 28% случаев инфицирования ПВГ. Результаты представлены в таблице.

Таблица – Прививочный статус против ВГВ инфицированных ПВГ работников организаций здравоохранения в 2016-2017 гг.

Прививочный статус	Этиология	Врачи	Средний	Младший	Всего
			медицинский	медицинский	
			персонал	персонал и др.	
Нет сведений о	ВГВ	6	22	35	63
прививках/не	ВГС	16	30	56	102
привиты					
Не полный курс	ВГВ	0	1	0	1
вакцинации (1 или 2	ВГС	2	1	7	10
прививки)					
Имеет полный курс	ВГВ	2	9	4	15
вакцинации (3	ВГС	14	51	24	89
прививки)					
Всего	ВГВ	8	32	39	79
	ВГС	32	82	87	201

Среди работников организаций здравоохранения с выявленным впервые ВГВ 79,7% были не привиты, 1,3% получили не полный курс вакцинации, а 19,0% были вакцинированы по схеме. Таким образом, если не учитывать частоту не выработки защитного титра антител после полного курса вакцинации и частоту распространения штаммов, ускользающих от действия вакцины, 81% случаев инфицирования ВГВ возможно было бы избежать, если бы все работники организаций здравоохранения были фактически привиты.

43,6% (122 человека) работников организаций здравоохранения, инфицированных вирусом гепатита С, остаются незащищенными от суперинфекции ВГВ (не вакцинированы, вакцинированы не полностью, см. таблицу), которая значительно утяжеляет течение и прогноз ВГС.

49,4% случаев инфицирования ВГВ произошло у младшего медицинского персонала и других работников организаций здравоохранения без медицинского образования, которые не подпадают под эпидемические показания вакцинации против ВГВ согласно Национальному календарю прививок «Работники здравоохранения, имеющие контакт с кровью и другой биологической жидкостью человека» [6] и остаются незащищенными.

Для изучения фактического состояния постпрививочного иммунитета были обследованы 214 медицинских работников УЗ «Гомельская областная инфекционная клиническая больница». Из них 133 (62,1%) человека получили полный курс прививок, 3(1,4%) – неполный, остальные 78 (36,4%) были не привиты или сведений о вакцинации в медицинской документации не было. В целом среди всех 214 обследованных у 110 (51,4%) титры антител были ниже защитного уровня. Среди 136 вакцинированных

медработников у 60 (44,1%) титры антител были ниже защитного уровня. В исследовании Акимкина В.Г. и соавт. (2017) описано естественное снижение с течением времени напряженности иммунитета против ВГВ в группе медицинских работников после 7 лет [1], а в исследованиях Калининой З.П. и соавт. (2015) — в течении 5 лет после проведенной вакцинации [7].

Полученные пилотные данные и результаты анализа литературы подтверждают необходимость проведения ревакцинации против вирусного гепатита В по результатам серологического обследования привитых лиц, оптимизации подходов специфической профилактики работников организаций здравоохранения и проведения исследований эффективности вакцинации в снижении заболеваемости ВГВ.

Выволы.

- 1. За 2016-2017 гг. официально зарегистрировано 280 случаев парентеральных гепатитов у работников медицинских учреждений, из которых 92% составляли женщины, 14% врачи и 41% средний медицинский персонал.
- 2. Среди впервые выявленных случаев преобладали случаи хронического гепатита С и носительства инфекции (69%), хронического гепатита В и носительства вируса гепатита В (26%), за 2 года выявлено 7 случаев острого ВГС и 5 случаев острого ВГВ. Согласно медицинской документации полный курс профилактических прививок против ВГВ получили 37,1% инфицированных ПВГ работников организаций здравоохранения. 19% работников, имеющих документально подтвержденный полный курс прививок против ВГВ, инфицировались ВГВ. 49,4% работников организаций здравоохранения, инфицированных ВГС, остаются незащищенными от суперинфекции ВГВ.
- 3. Среди медработников у 51,4% отсутствует защитный уровень антител к HBsAg, нарушение схемы вакцинации выявлено у 1,4%, не вакцинированы или нет сведений о прививках в медицинской документации у 36,4% работников организаций здравоохранения, что делает их восприимчивыми к заражению гепатитом В, в т.ч. при оказании медицинской помощи инфицированным пациентам.
- 4. Необходимо допускать к профессиональной деятельности медицинских работников только после полного курса вакцинации против гепатита В, обеспечить строгое соблюдение ими мер профилактики заражения парентеральными инфекциями, а также периодически проверять уровень иммунологической защиты и проводить ревакцинацию лиц с отсутствием защитного титра антител, вне зависимости от давности вакцинации, с учетом рекомендаций ВОЗ и инструкций по медицинскому применению иммунобиологических лекарственных средств.
- 5. Важно проводить вакцинацию всех работников организаций здравоохранения вне зависимости от характера выполняемой работы и уровня образования.

Литература

- 1. Акимкин, В.Г. Эпидемиологическая и иммунологическая эффективность вакцинации медицинских работников против гепатита В / В.Г. Акимкин, Т.А. Семененко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. -2017. -№ 4. C. 52-57.
- 2. The prevalence of hepatitis C among healthcare workers: a systematic review and meta-analysis / C. Westermann [et al.] // Occup. Environ. Med. 2015. Vol. 72, N 12. P. 880-888.
- 3. Lewis, J.D. Hepatitis B in healthcare workers: Transmission events and guidance for management / J.D. Lewis, K.B. Enfield, C.D. Sifri // World J. Hepatol. -2015. Vol. 7, N 3. P. 488-497.
- 4. Blood-borne viruses in health care workers: prevention and management / S. Deuffic-Burban [et al.] // J. Clin. Virol. 2011. Vol. 52, N 1. P. 4-10.
- 5. Волченко, А.Н. Заболеваемость медицинских работников парентеральными вирусными гепатитами в Республике Беларусь в 2010-2014 годах / А.Н. Волченко, В.В. Запольская, Е.Б. Варивода // Современные проблемы инфекционной патологии человека [Электронный

ресурс] : сб. науч. ст. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. – Минск : ГУ РНМБ, 2015. – Вып. 8. – С. 50-55. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

- 6. Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 17 мая 2018 г. № 42 «О профилактических прививках».
- 7. О поствакцинальном иммунитете против вирусного гепатита в у медицинских работников Санкт-Петербурга / 3.П. Калинина [и др.] // Инфекция и иммунитет. 2015. T. 5, No. 1. T. 89-92.

VACCINATION STATUS AND PARENTERAL VIRAL HEPATITIS MORBIDITY IN HEALTH CARE WORKERS IN THE REPUBLIC OF BELARUS IN 2016-2017

A.N. Volchenko¹, V.M. Mitsura², V.V. Zapolskaya³, D.V. Tereshkov², V.S. Vysotskaya³, V.V. Pashkovich³, I.N. Glinskaya³
Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk;

Gomel State Medical University, Gomel; Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

There were 280 cases of parenteral viral hepatitis (PVH) were reported in health care workers of Republic of Belarus in 2016-2017. Of the total cases, 58.9% of persons had no information about preventive vaccinations in medical records or were not vaccinated; 37.1% of persons received a full vaccination course; 3.9% of employees received an incomplete vaccination course. Among the reported PVH cases, viral hepatitis C was in 72% of cases, viral hepatitis B was in 28%. Among health care workers with viral hepatitis B 79.7% were not vaccinated, 1.3% received incomplete vaccination course, and 19.0% were vaccinated according to the scheme. When studying the actual immunity level among 136 vaccinated (fully and partially) health care workers, antibody titers were below the protective level in 60 (44.1%) persons.

Keywords: parenteral viral hepatitis, viral hepatitis B, viral hepatitis C, vaccination, health care workers, Belarus.

Поступила 23.11.2018

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В СРЕДИ НАСЕДЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

В.С. Высоцкая¹, А.Н. Волченко², Н.Д. Коломиец²

¹ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; ²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

В Республике Беларусь Резюме. c момента введения массовой вакцинопрофилактики новорожденных и взрослых отдельных групп (1996 г.) заболеваемость вирусным гепатитом В (ВГВ) всего населения к 2017 г. сократилась в 5,4 раза (14.93 случая на 100 тыс. населения). Заболеваемость детского населения снизилась в 82,8 раза (с 4,97 случаев на 100 тыс. детского населения до 0,06 в 2016 г.). Заболеваемость острым гепатитом В в 2017 г. была в 19,5 раза ниже аналогичного показателя в 1996 г. В последние 5 лет максимальная заболеваемость всеми формами ВГВ регистрировалась в группе 30-39 лет (68,3% от всех зарегистрированных случаев), охват вакцинацией подлежащих контингентов в которой составляет 27,9%. Охват профилактическими прививками всего населения по состоянию на 01.01.2018 составил 37,1%, детского населения – 98,0%.

Ключевые слова: вирусный гепатит В, инфекция, заболеваемость, вакцинация, Республика Беларусь.

Введение. В настоящее время в мире более 2-х миллиардов человек инфицированы вирусом гепатита В (ВГВ), из них восьмая часть (3,7% населения земного шара) являются хроническими носителями поверхностного антигена ВГВ (HBsAg). В мировом масштабе ВГВ ежегодно является причиной смерти около 780 000 человек и занимает 15-е место среди всех причин смерти [1, 2]. В Европейском регионе ВОЗ примерно 15 млн. человек страдают хронической инфекцией, вызванной ВГВ, которая у 20-30% пациентов может приводить к циррозу и раку печени [3].

Предложенная ВОЗ универсальная тактика вакцинопрофилактики вирусного гепатита В, заключающаяся в вакцинации всех новорожденных и лиц из групп риска, в рамках национальных программ иммунизации, позволили стать на путь контроля распространения ВГВ. Основным итогом различных программ вакцинации, проводимых во многих странах мира, является не только значительное снижение заболеваемости острым гепатитом В (ОГВ), но и ограничение распространения случаев хронического гепатита и цирроза печени [4]. Учитывая процент эффективности вакцинации у здоровых людей, высказано предположение о том, что от 537 тыс. до 660 тыс. смертей, связанных с ВГВ, можно было бы предотвратить ежегодно с помощью массовой вакцинации [5].

Целью настоящей работы явились характеристика эпидемиологического процесса течения вирусного гепатита В и роль вакцинации на снижение его интенсивности.

Материалы и методы. Оценка уровней заболеваемости и охвата профилактическими прививками против ВГВ-инфекции населения в целом и его отдельных групп проводилась на основании данных форм государственной статистической отчетности «Отчет об отдельных инфекционных, паразитарных заболеваниях и их носителях», «Отчет о проведенных профилактических прививках».

Обработка данных и анализ результатов проводились с использованием методов эпидемиологической диагностики: ретроспективный эпидемиологический анализ, описательно-оценочные методы, статистический метод [6, 7].

Результаты и обсуждение. На протяжении 1965-2017 гг. эпидемический процесс ВГВ-инфекции характеризовался периодами средней и низкой интенсивности. В течение

1965-1973 гг. заболеваемость не превышала 8 случаев на 100 тыс. населения. Среднемноголетний показатель за этот период составил 16,53%000.

Вступление в силу приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 20.04.1993 № 66 «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь» определило дальнейшее становление системы лабораторной диагностики, регистрации и учета ВГВ-инфекции, которые на начальных этапах реализации приказа в силу несовершенств методов дифференциальной диагностики и постановки диагнозов, позволяют говорить не о конкретных показателях заболеваемости отдельных форм, а о распространенности парентеральных вирусных гепатитов в целом.

Вакцинопрофилактика вирусного гепатита В в Республике Беларусь начала осуществляться с 1993 г. При этом программы иммунизации реализовывались поэтапно и вначале характеризовались селективностью подходов, ориентированной на отдельные возрастные и социальные группы населения, подверженные наибольшему риску инфицирования (медицинские работники, имеющие контакт с биологическим материалом при осуществлении профессиональной деятельности, доноры крови и ее компонентов). В дальнейшем вакцины стали применять для иммунизации новорожденных, рожденных от матерей-носителей HBsAg и пациентов с вирусным гепатитом В, а также детей 14 лет (с 1997 г.), а затем для 3-дозовой схемы иммунизации всех новорожденных и не привитых подростков 13 лет (с 2000 г.). С 2000 г. с введением в практику новых редакций национального календаря профилактических прививок была определена основная стратегия и тактика вакцинации на следующие 12 лет как среди населения в целом в виде вакцинации новорожденных сначала в первые 24 часа жизни (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.09.1999 № 275), затем в первые 12 часов жизни (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.12.2006 № 913), так и среди определенных групп (не привитые подростки 13 лет, отдельные профессиональные группы, лица в очагах вирусных парентеральных гепатитов и др.). Сложившаяся тактика вакцинации нашла продолжение в национальном календаре профилактических прививок, утвержденном постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 18.06.2012 № 106, в котором так же был определен порядок иммунизации против вирусного гепатита В детей, родившихся от HBsAg-позитивных матерей, лиц в рекомендательном порядке и по эпидемическим показаниям.

Исходя из вышеизложенного изучение проявления эпидемического процесса острого гепатита В целесообразно проводить с 2000 г. Так, многолетняя динамика заболеваемости ОГВ с 2000 г. характеризуется достоверной выраженной тенденцией к снижению с темпом снижения в среднем по республике -14,5% (p <0,05) (рисунок 1).

В 2018 г. в связи с внедрением в национальный календарь комбинированных многокомпонентных вакцин осуществлен переход на 4-х дозовую схему вакцинации против вирусного гепатита В (введение 1 дозы монокомпонентной вакцины при рождении и 3-х доз содержащей компонент ВГВ комбинированной вакцины в дальнейшем).

Проведение вакцинопрофилактики создало предпосылки для эффективного управления эпидемическим процессом вирусного гепатита В. В 2017 г. в Республике Беларусь зарегистрирован минимальный уровень заболеваемости ОГВ (0,84 на 100 тыс. населения), который в 19,5 и 11,1 раз ниже аналогичных показателей 1996 г. и 2000 г. соответственно.

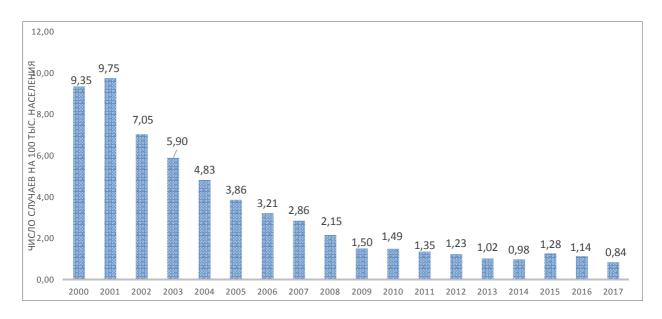


Рисунок 1. – Динамика заболеваемости острым вирусным гепатитом В за период 2000-2017 гг. в Республике Беларусь

За последние девять лет показатели заболеваемости ОВГ остаются стабильно низкими с колебаниями от 1,5 до 0,84 на 100 тыс. населения. С 2013 г. ежегодно в стране регистрируется около 1,4 тыс. случаев ВГВ-инфекций, из которых более 90% составляют хронические (ХГВ) и латентно текущие формы, которые и поддерживают циркуляцию ВГВ в популяции. Так, на 1 регистрируемый случай ОГВ в 2017 г. приходится 16,7 случаев суммарного количества зарегистрированных форм «носительство HBsAg + $X\Gamma$ B», что в 4,3 раза превышает аналогичное соотношение в 2002 г. (рисунок 2).

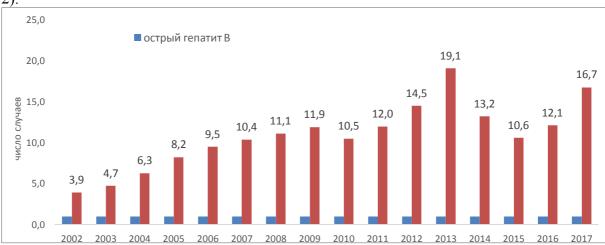


Рисунок 2. – Динамика соотношения регистрации случаев «носительство HBsAg + XГВ» к случаям ОГВ за период 2002-2017 гг. в Республике Беларусь

До 2012 г. показатели носительства HBsAg превышали показатели заболеваемости как ОГВ, так и ХГВ. С 2014 г. отмечается постепенно нарастающее превалирование показателей заболеваемости хроническими формами над носительством HBsAg от 1,6 до 2,4 раза. На фоне выраженной тенденции к снижению регистрации случаев носительства HBsAg с темпом снижения -5% (р <0,05) сформировалась умеренная тенденция к росту заболеваемости ХГВ (+1,5%), что в определенной мере является следствием улучшения

диагностики хронических гепатитов. Несмотря на уменьшение количества носителей HBsAg, суммарный показатель латентного компонента BГВ в 10,6-16,7 раз превышает показатель заболеваемости ОГВ. Таким образом, развитие эпидемического процесса ВГВ-инфекции определяется хроническими и скрыто протекающими формами, имеющими высокую медицинскую и социальную значимость, на фоне снижения регистрируемой заболеваемости ОГВ. Аналогичные характеристики эпидемического процесса ВГВ-инфекции отмечены и на территории регионов Российской Федерации, и описаны другими исследователями [8-10].

На фоне снижения общей заболеваемости ВГВ-инфекции заболеваемость среди детей в возрасте до 15 лет сократилась в 82,8 раза (с 4,97 в 1996 г. до 0,06 на 100 тыс. контингента в 2016 г.). Среди детского населения (0-14 лет) в довакцинальный период регистрировалось до 110 случаев ОГВ в год, причем более 60% всех случаев приходилось на возрастную группу 7-14 лет. Начиная с 2004 г., когда охват профилактическими прививками против вирусного гепатита В достиг 99% в группе детей 1 года и 97% в группе детей 13 лет, количество случаев среди детей 0-14 лет сократилось до 10 и менее в год. С 2007 г. в стране регистрируются спорадические случаи ОГВ (1-2 случая в год) у непривитых в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок детей 0-2 года и практически отсутствует заболеваемость ОГВ в возрастных группах детей старше 3 лет (рисунок 3).

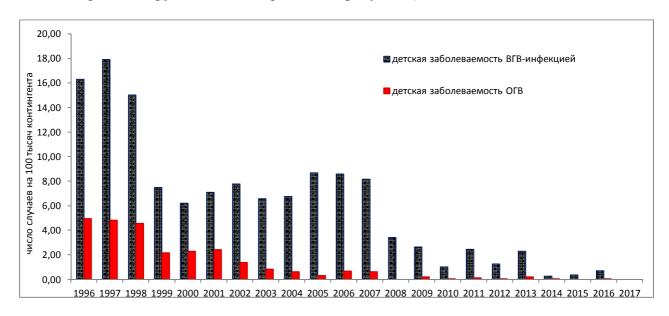


Рисунок 3. — Динамика общей заболеваемости ВГВ-инфекции и заболеваемости ОГВ среди детского (0-14 лет) на фоне общей заболеваемости населения ВГВ-инфекции за период 1996-2017 гг.

Установлена обратная сильная корреляционная зависимость (r = -0,85; p <0,05) между уровнями заболеваемости ОГВ и охватом профилактическими прививками детского населения, что согласуется с данными других исследователей [9].

Результатом иммунизации населения явилось также существенное снижение заболеваемости ОГВ взрослого населения с 12,45 в 1998 г. до 1,04 на 100 тыс. контингента в 2017 г., т.е. более, чем в 12 раз. Тенденция к снижению заболеваемости отмечается во всех когортах взрослого населения. С 2014 г. наметилась тенденция к снижению заболеваемости взрослых 21-29 лет и увеличению доли заболевших в возрасте 30-49 лет с 52,7% в 2014 г. до 66,3% в 2017 г. Возможно, это можно объяснить более

низкой защищённостью лиц более старшего возраста в виду наличия значительной части неподлежащих плановой вакцинации лиц этого возрастного диапазона (27,9% и ниже).

Масштабное проведение плановой вакцинопрофилактики вирусного гепатита В среди новорожденных на протяжении 17 лет, а также вакцинация отдельных групп населения увеличило иммунную популяционную прослойку, косвенным показателем которой является величина охвата профилактическими прививками (по данным медицинской документации), которая по состоянию на 01.01.2018 составила в целом по стране 37,1%. В когорте детского населения (0-17 лет) показатель охвата законченной вакцинацией не опускается ниже 98,0%, что соответствует рекомендациям ВОЗ.

Выводы. В многолетней динамике заболеваемости ВГВ-инфекции на фоне снижения регистрируемой заболеваемости ОГВ (средний темп снижения -14,5%, р <0,05) развитие эпидемического процесса определяется хроническими и скрыто протекающими вариантами инфекции. При этом на фоне выраженной тенденции к снижению регистрации случаев носительства HBsAg с темпом -5% (р <0,05) сформировалась умеренная тенденция к росту заболеваемости $X\Gamma B$ (+1,5%, p <0,05), что в определенной мере является следствием улучшения диагностики хронических гепатитов.

Выявленные современные характеристики и основные тенденции развития эпидемического процесса ВГВ-инфекции (изменение возрастной структуры заболеваемости в сторону превалирования заболеваемости взрослого социально активного преимущественно не вакцинированного населения) служат источниками формирования и доминирования хронических форм инфекции.

Проведение анализа влияния вакцинопрофилактики на эпидемический процесс при остром и хроническом гепатите В требует дифференцированных подходов. Наибольшее влияние специфическая профилактика оказала на интенсивность эпидемического процесса при ОГВ. Заболеваемость им среди детей снизилась в десятки раз (до единичных случаев), среди населения в целом — в 19,5 раз.

В условиях проведения плановой массовой вакцинации против вирусного гепатит В новорожденных актуальным является динамическое слежение за развитием эпидемического процесса ВГВ-инфекции, а также за состоянием специфического популяционного иммунитета к ВГВ с последующим формированием предложений по комплексу профилактических мероприятий с учетом современных эпидемиологических аспектов инфекции.

Литература

- 1. Gerlich, W.H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now / W.H. Gerlich // Virol. J. 2013. Vol. 10. P. 239. doi: 10.1186/1743-422X-10-239
- 3. Гепатит В в Европейском регионе ВОЗ [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. Режим доступа: http://www.amtbuiucani.ms.md/files/file/IMSP%20AMT%20BUIUCANI/Fact%20Sheet%20Hepatitis%20B%20RUS .pdf. Дата доступа: 27.08.2018.
- 4. Брико, Н.И. Вакцинация решающая мера снижения бремени, связанного с инфекционными болезнями среди взрослых лиц / Н.И. Брико // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013. № 4. С. 10-15.
- 5. Доклад ВОЗ 2017. 4. Еженедельный эпидемиологический бюллетень 7 июля 2017 года. 2017. Т. 92, № 27. С. 369-392.
- 6. Методы эпидемиологической диагностики: учеб.-метод. пособие / Γ .Н. Чистенко [и др.]; под ред. Γ .Н. Чистенко. Минск: Γ МУ, 2003. 184 с.

- 7. Применение статистических методов в эпидемиологическом анализе / Е.Д. Савилов [и др.]. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 112 с.
- 8. Полянина, А.В. Иммунологическая структура к вирусу гепатита В населения Нижнего Новгорода в условиях массовой вакцинопрофилактики. / А.В. Полянина, Т.Н. Быстрова, О.Н. Княгина // Медицинский альманах. -2017. -№ 4. -C.86--90.
- 9. Шулакова, Н.И. Итоги массовой иммунизации против гепатита В / Н.И. Шулакова // 3HиCO. -2016. № 6. С. 49-53.
- 10. Косаговская, И.И. Медико-социальные аспекты вирусных гепатитов с парентеральным путем передачи / И.И. Косаговская, Е.В. Волчкова // Эпидемиология и инфекционные болезни. -2013. -№ 1. C. 28-39.

CHARACTERISTICS OF THE HEPATITIS B VIRUS EPIDEMIC PROCESS AMONG THE POPULATION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

V.S. Vysotskaya¹, A.N. Volchenko², N.D. Kolomiets²

¹Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health; ²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

In the Republic of Belarus since introduction of mass vaccination for all newborns and adults of certain groups (in 1996), incidence of hepatitis B virus (HBV) infection in whole population has decreased in 5.4 times by 2017 (14,93 cases per 100.000 population). Incidence of child population decreased in 82.8 times (from 4.97 cases per 100.000 child population to 0.06 in 2016). Acute HBV rate became in 19.5 times lower by 2017. In the last 5 years, the maximum of all HBV-infection forms incidence registered in the group of 30-39 years (68.3% of all reported cases); vaccination coverage in this group was 27.9%. On 01.01.2018, the vaccination coverage of the whole population was 37.1%, and for child population was 98.0%.

Keywords: hepatitis B virus, infection, morbidity, vaccination, Belarus.

Поступила 20.11.2018

ЛАБОРАТОРНАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ КОРИ И КРАСНУХИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛИХОРАДКОЙ И СЫПЬЮ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2018 г.

М.А. Ермолович, Е.О. Самойлович, Г.В. Семейко, Е.Ю. Свирчевская ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

Резюме. Выполнение Программы элиминации кори и краснухи в Европейском регионе ВОЗ требует проведения надзора за этими заболеваниями, основанного на лабораторных данных. В Республике Беларусь в январе-октябре 2018 г. при проведении лабораторного обследования 638 пациентов диагноз корь был подтвержден в 225 (35,3%) случаях, диагноз краснуха – в двух (0,3%). Показатель исключенных случаев (ни корь, ни краснуха) составил 4,4 на 100 000 населения. Наибольшее число случаев кори выявлено в Гомельской и Гродненской областях – 120 и 44, соответственно; подъем заболеваемости в каждой из них продолжался не более трех месяцев. В возрастной структуре заболевших преобладали лица 26-40 лет (53%). Анализ лабораторно верифицированных случаев кори свидетельствует о высоком качестве подтверждает эффективность проводимого надзора И проводимых противоэпидемических мероприятий. Для решения вопроса о необходимости коррекции вакцинации требуется проведение дополнительных тактики сероэпидемиологических исследований.

Ключевые слова: корь, краснуха, эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика, Беларусь.

Введение. Корь и краснуха являются вакциноуправляемыми инфекциями, в отношении которых в Европейском регионе ВОЗ поставлена цель элиминации. Для достижения этой цели, наряду с высоким уровнем охвата вакцинацией, требуется проведение качественного эпидемиологического надзора, который необходим как для принятия ответных мер при выявлении заболевания, так и для убедительного подтверждения отсутствия случаев кори и краснухи. Надзор считается проводимым адекватно, если в стране ежегодно на каждые 100 000 населения выявляется не менее 2 случаев с подозрением на корь и краснуху, в которых на основании данных лабораторного обследования обе эти инфекции исключены [1]. Такая тактика рассчитана на благополучную эпидемическую ситуацию, когда случаи кори и краснухи встречаются достаточно редко, и обследование необходимого числа подозрительных пациентов помогает их не пропустить.

В Европейском регионе ВОЗ 2018 г. характеризуется резким ростом заболеваемости корью. Число случаев, зарегистрированных за январь-сентябрь, составило более 54 000, что в 2,5 раза превысило число случаев за 2017 г. (22 360) и в 10 раз — за 2016 г. (5 273). Наиболее высокая заболеваемость регистрируется в Украине, где в течение января-сентября 2018 г. было выявлено более 30 000 случаев кори, из которых 14 имели летальный исход [2].

В Республике Беларусь эндемичная циркуляция вируса кори и краснухи отсутствует с 2004 г. В последние 10 лет в стране ежегодно регистрируются единичные случаи этих инфекций или незначительные подъемы заболеваемости, которые обусловлены завозами возбудителя из других стран и последующим их ограниченным распространением [3]. В 2016 г. в Беларуси зарегистрировано 10 случаев кори и ни одного случая краснухи, в 2017 г. – по одному случаю кори и краснухи. Эпидемиологический надзор за корью и краснухой в Беларуси организован в соответствии с Санитарными нормами и правилами [4] Обследованию подлежат пациенты любого возраста с клиническими симптомами, сопоставимыми с корью и

краснухой, независимо от первичного диагноза. Лабораторное обследование проводится в республиканской лаборатории по кори и краснухе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Цель настоящего исследования — провести анализ лабораторно верифицированных случаев кори и краснухи, выявленных у пациентов с температурой и сыпью в Беларуси в январе-октябре 2018 г.

Материалы и методы. В период января-октября 2018 г. для верификации диагноза кори и краснухи были обследованы 638 пациентов, выявленные во всех регионах Республики Беларусь в рамках проведения эпидемиологического надзора за этими инфекциями [4].

Основным лабораторной метолом диагностики служило обнаружение специфических IgM антител в ИФА. Для обнаружения антител класса IgM и IgG к И краснухи использовались соответствующие коммерческие иммуноферментные тест-системы производства Siemens (Германия), Euroimmune (Германия), Humans (Германия), Вектор-БЭСТ (Российская Федерация), Диапроф-Мед (Украина). В ряде случаев проводилось обнаружение РНК вируса кори или вируса краснухи в образцах носоглоточных мазков и мочи в ОТ-ПЦР [5].

Результаты и обсуждение. В период январь—октябрь 2018 г. при проведении лабораторного обследования на корь и краснуху 638 пациентов из всех регионов страны диагноз корь был подтвержден в 225 (35,3%) случаях, диагноз краснуха — в двух (0,3%).

Лабораторно верифицированные случаи краснухи были выявлены в г. Минске у граждан Индии, тесно связанных между собой и прибывших на территорию Беларуси за неделю до начала первого случая. Подтверждение диагноза получено на основании выявления вирус-специфических IgM и PHK вируса краснухи. Ни у одного из граждан Республики Беларусь случаев краснухи выявлено не было.

Из 225 лабораторно верифицированных случаев кори в 175 диагноз был установлен на основании выявления вирус-специфических IgM, в двух — на основании выявления вирусной РНК, и в 48 — на основании как серологических данных, так и молекулярно-генетических данных.

Случаи кори были лабораторно подтверждены во всех регионах страны с наибольшим их числом в Гомельской и Гродненской областях (рисунок 1).



Рисунок 1. — Распределение лабораторно верифицированных случаев кори и краснухи по регионам Беларуси в 2018 г. (январь-октябрь)

В 2018 г. первые заболевшие корью были выявлены в феврале, и в дальнейшем случаи кори регистрировались ежемесячно (рисунок 2). Основная доля случаев, 67,1% (151/225), пришлась на три месяца с марта по май. В дальнейшем число заболевших уменьшилось, и в последующие пять месяцев с июня по октябрь было подтверждено лишь 25,3% случаев с наименьшим их количеством в октябре (2 случая).

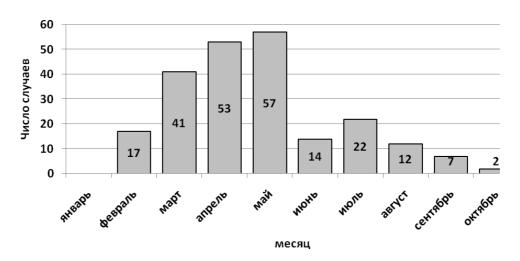


Рисунок 2. – Распределение лабораторно верифицированных случаев кори по месяцам, январь—октябрь 2018 г.

Анализ помесячного распределения случаев кори в каждом из регионов страны показывает, что ни в одной из областей и г. Минске корь не регистрировалась ежемесячно (таблица 1). В областях с наибольшим числом заболевших, Гомельской и Гродненской, практически все случаи были выявлены с марта по май и с февраля по март, соответственно. В Гомельской области на указанный период времени пришлось 98,3% (118/120) случаев, в Гродненской — 86,4% (38/44). Представленные данные показывают, что подъем заболеваемости корью имел место на ограниченных территориях и продолжался не более 2-3 месяцев.

Таблица 1. – Распределение лабораторно верифицированных случаев кори и краснухи по месяцам в регионах Республики Беларусь, январь-октябрь 2018 г.

Мооди		Область					
Месяц Брестская	Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	г. Минск	Минская	Могилевская
январь	-	-	-	-	-	-	-
февраль	-	-	-	17	-	-	-
март	1	-	20	20	-	-	-
апрель	4	-	47	-	2	-	-
май	-	-	52	1	1	3	-
июнь	-	5	-	1	3	-	5
июль	3	9	-	2	2	2	2
август	-	-	1	2	1	8	1
сентябрь	-	-	-	-	3	3	1
октябрь	-	-	-	1	1	-	-

В остальных областях страны ежемесячно выявлялись лишь единичные случаи кори, преимущественно на протяжении двух-четырех последовательных месяцев, за исключением г. Минска, где единичные случаи регистрируются в течение семи последовательных месяцев. В областях с низкой заболеваемостью рост числа случаев преимущественно происходил в летние месяцы, когда традиционно миграционные процессы населения выше, и люди более активно посещают зарубежные страны.

Случаи кори в 2018 г. были лабораторно подтверждены у лиц в возрасте от 2 месяцев до 63 лет (рисунок 3).



Рисунок 3. – Распределение лабораторно верифицированных случаев кори по возрастам, январь-октябрь 2018 г.

Дети моложе 1 года, по возрасту не успевшие получить прививку против кори (в Беларуси вводится в 12 месяцев жизни), составили 3% заболевших. На лиц в возрасте 51 год и старше, которые в соответствии с национальной программой иммунизации (началась в 1967 г.) не могли быть привиты против кори, и большинство из которых переболели этой инфекцией еще в детстве, также пришлось 3% случаев.

При анализе остальных заболевших по возрастным группам с пятилетним интервалом установлено, что наибольшую долю составили лица 26-30 лет (17%), 31-35 лет (20%) и 36-40 лет (16%), и в целом на лиц 26-40 лет пришлось 53% случаев (рисунок 4). На другие возрастные группы пришлось от 4% до 9% заболевших.

В соответствие с национальным календарем иммунизации лица, рожденные в 1995 году и позднее, подлежали вакцинации с использованием комбинированной вакцины корь-паротит-краснуха (КПК). Лица, рожденные в 1967-1994 году, прививались моновалентной вакциной против кори, при этом до 1986 года проводилась однократная вакцинация, а с 1987 года в календарь была введена ревакцинация детей в возрасте 7 лет. Анализ, проведенный в учетом этих различий, показал, что у детей, подростков и молодых взрослых 1-22 лет, которые должны были получить вакцинацию КПК, зарегистрировано 49 случаев кори (21,7%). У лиц старше этого возраста, подлежавших вакцинации моновакциной, выявлено 163 случая кори (72,4% заболевших).

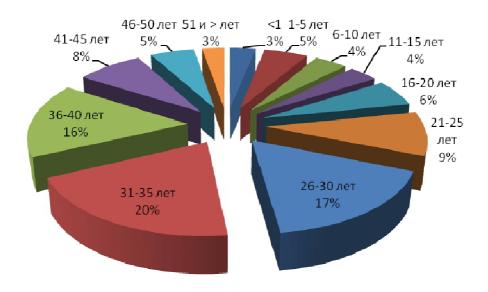


Рисунок 4. — Распределение лабораторно верифицированных случаев кори по возрастным группам, январь — октябрь 2018 года

Несмотря на то, что в январе-октябре 2018 г. в стране зарегистрировано существенно большее число случаев кори, чем в предыдущие годы, у значительной части пациентов причиной лихорадки и сыпи явились не корь, и не краснуха. Из 638 обследованных у 412 оба эти диагноза были отвергнуты и, соответственно, показатель отвергнутых случаев на национально уровне составил 4,4 на 100 000 населения, что более чем в 2 раза превышало минимально необходимый (2 на 100 000) (таблица 2).

Таблица 2. – Число и показатель выявления случаев, лабораторно верифицированных как «ни корь, ни краснуха», в регионах Беларуси, январь-октябрь 2018 г.

Область	Число подозрительных случаев	Число исключенных случаев кори/краснухи	Показатель исключенных случаев на 100 000 населения
Брестская	69	60	4,3
Витебская	40	26	2,2
Гомельская	208	88	6,2
Гродненская	78	34	3,3
г. Минск	61	47	2,4
Минская	93	77	5,4
Могилевская	89	80	7,6
Всего	638	412	4,4

В областях страны и г. Минске значения показателя отвергнутых случаев различались, однако везде превышали необходимую величину.

Заключение. В рамках проведения эпидемиологического надзора за корью и краснухой в январе-октябре 2018 г. в Беларуси было обследовано 638 пациентов с подозрением на эти заболевания и в 225 случаях был подтвержден диагноз корь. Заболевание краснухой было подтверждено только у двух временно пребывающих в нашей стране граждан Индии. Число лабораторно верифицированных случаев кори существенно превысило аналогичный показатель предыдущих лет, что явилось

отражением значительного подъема заболеваемости корью в 2018 г. во многих странах ближнего и дальнего зарубежья. Несмотря на рост заболеваемости корью, в значительной доле подозрительных случаев этот диагноз, так же, как и диагноз краснухи, были отвергнуты, и показатель отвергнутых случаев составил 4,4 на 100 000 населения на национальном уровне и от 2,2 до 7,6 на 100 000 населения в каждом из регионов страны (при рекомендуемом ВОЗ 2 на 100 000), что свидетельствует о существовании постоянной настороженности медицинских работников в отношении кори и краснухи в стране.

Анализ лабораторно верифицированных случаев кори свидетельствует о том, что подъем заболеваемости происходил на ограниченных территориях и продолжался не более 2–3 месяцев, что подтверждает эффективность проводимых в стране противоэпидемических мероприятий. Преобладание среди заболевших взрослых в возрасте 26 – 40 лет свидетельствует о необходимости проведения масштабных сероэпидемиологических исследований для оценки популяционного иммунитета во всех возрастных группах населения и решения вопроса о необходимости коррекции тактики вакцинации.

Литература

- 1. World Health Organization (WHO). Global measles and rubella strategic plan: 2012-2020 [Electronic resource]. Geneva, Switzerland: WHO, 2012. 42 p. Mode of access: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44855/1/9789241503396_eng.pdf. Date of access: 30.05.2018.
- 2. Эпидемиологические данные ВОЗ: ежемесячная сводка эпидемиологических данных об отдельных управляемых инфекциях в Европейском регионе [Электронный ресурс]. Копенгаген, Дания: ЕРБ ВОЗ, 2018. № 10. Режим доступа: http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/vaccines-and-immunization/publications/surveillance-and-data/who-epidata/who-epidata,-no2.-92018 Дата доступа: 22.11.2018
- 3. Достижения в элиминации кори и краснухи в Республике Беларусь / Е.О. Самойлович [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. -2016. N 4. С. 94-99.
- 4. Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кори и краснухи: утв. постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 26.12.2013, № 130.
- 5. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2nd ed. Geneva: WHO, 2006. 100 p.

LABORATORY VERIFICATION OF MEASLES AND RUBELLA IN PATIENTS WITH EXANTHEMA AND FEVER IN THE REPUBLIC OF BELARUS IN 2018

M.A. Yermalovich, E.O. Samoilovich, G.V. Semeiko, E.Iu. Svirchevskaya Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

The implementation of the Measles and Rubella Elimination Program in the WHO European Region requires laboratory-based surveillance of these diseases. In the period for January – October 2018, the laboratory examination have done for 638 patients from all regions of the country and measles was confirmed in 225 (35.3%) cases, and rubella in two (0.3%) cases. The rate of excluded cases (neither measles nor rubella) was 4.4 per 100,000 population. The largest number of measles cases was found in the Gomel and Grodno regions, 120 and 44, respectively; the rise in incidence in each of them lasted no more than three months. Persons of 26–40 years old prevailed in the age structure of the patients (53%). The analysis of laboratory confirmed measles cases testifies the high quality of the surveillance and the effectiveness of the anti-epidemic measures taken. To clarify the need for correction of vaccination tactics, it is necessary to conduct large-scale seroepidemiological studies.

Keywords: measles, rubella, epidemiological surveillance, laboratory diagnosis, Belarus.

Поступила 27.11.208

О МЕРАХ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.В. Ильяшева, Г.В. Садовникова, Л.В. Глебко, Л.Н. Рудая

ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Брест, Беларусь

Резюме: Эпидемиологический процесс по распространению ВИЧ-инфекции претерпевает характерные изменения и носит многообразный характер. Модели и скорость распространения ВИЧ-инфекции определяет ряд факторов. Особое значение приобретают социально-экономические, поведенческие, демографические факторы. В Брестской области высокий рост числа инфицированных связан с трудовой миграцией, с выездами граждан на заработки в Российскую Федерацию, Украину, вовлечение в эпидпроцесс социально-благополучных слоев населения, не относящиеся к группам повышенной уязвимости (потребители инъекционных наркотиков, гомосексуальные контакты и др.) Стабильно высокий уровень заболеваемости ВИЧ-инфекцией регистрируется в Пинске, Бресте, Барановичах, Лунинецком районе, на которые приходится 70,5% заболеваемости.

Задача по предупреждению ВИЧ-инфекции на современном этапе рассматривается как одно из приоритетных направлений государственной политики в области профилактики ВИЧ/СПИД. Несмотря на комплекс целенаправленно проводимых профилактических медицинских мероприятий, имеются объективные трудности в достижении ожидаемой эффективности, связанные с особенностями проведения мониторинга и эпидскрининга за распространением ВИЧ-инфекции. С учётом происходящих изменений в развитии эпидпроцесса требуются совершенствование, развитие инновационных подходов в проведении дифференцированного эпидскрининга за распространением ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, мониторинг, эпидемиологический надзор, профилактика, Брестская область, Беларусь.

Введение. В Брестской области значимость проблемы ВИЧ-инфекции, как и в целом в Республике Беларусь не снижается, сохраняется тенденция по развитию эпидемического процесса с расширением его ареала. Эпидемический процесс по распространению ВИЧ-инфекции стабильно прогрессирует и развивается согласно законам эпидемиологии, касающихся медленных вирусных инфекций. Ежегодно регистрируются темпы прироста заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Эпидемический процесс носит многообразный характер. Модели и скорость распространения ВИЧ-инфекции определяет ряд факторов. Особое значение приобретают социально-экономические, поведенческие, демографические факторы [1-3].

В области, реализуется активная позиция и заинтересованность в достижении к 2020 году глобальной цели «90-90-90» (90% людей, живущих с ВИЧ, должны узнать свой ВИЧ-статус, 90% лиц, живущих с ВИЧ, должны получать антиретровирусную терапию, 90%, получающих антиретровирусную терапию, должны иметь неопределяемую вирусную нагрузку). В настоящее время на 01.10.2018 в области выявлено 1773 человека, живущих с ВИЧ, что составляет 78,2% от оценочного показателя, рассчитанного компьютерной программой «Спектрум».

Во исполнение подпрограммы 5 «Профилактика ВИЧ-инфекции» Государственной программы «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь на 2016-2020 годы», действующих организационно-распорядительных документов сложилась целенаправленная система действий, направленная на реализацию

мероприятий по выявлению ВИЧ-инфекции и проведению противоэпидемических мероприятий, способствующих предупреждению распространения ВИЧ-инфекции среди населения области.

Цель исследований – разработка адекватных мер по предупреждению дальнейшей циркуляции ВИЧ среди населения и планирование мероприятий по минимизации последствий. Проблема так называемых групп повышенной уязвимости, на которую делались основные акценты в период начальных стадий развития эпидемии в настоящее время не снимается с повестки дня, однако утрачивает ведущие позиции.

Материалы и методы. Для исследования применялись методы эпидемиологической диагностики: ретроспективный эпидемиологический анализ, статистический и описательно-оценочные методы.

По-прежнему основным инструментом по раннему выявлению ВИЧ-инфекции остаётся проведение мониторинга и эпидскрининга за её распространением. Намечен ряд мер по совершенствованию мониторинга, эпидскрининга (классическим методом ИФА-ВИЧ и методом экспресс-тестирования) в целях принятия адекватных мер по предупреждению дальнейшего распространения ВИЧ и планирования мероприятий по минимизации последствий.

Начиная с 2016 г. в области внедрена методика исследований на ВИЧ методом экспресс-диагностики. В настоящее время тест-системами для экспресс-диагностики по крови обеспечены все организации здравоохранения области для проведения экстренной диагностики ВИЧ-инфекции у беременных женщин при поступлении в роды с неизвестным ВИЧ-статусом, беременных из уязвимых к ВИЧ групп населения и в других случаях, требующих срочной дифференциальной диагностики, а также в случае аварийных ситуаций.

Кроме того, с апреля 2018 г. решен вопрос продажи экспресс-тестов по слюне «Мульти-тест» (производитель ООО «Мульти Лаб», РБ) через аптечную сеть Брестское РУП «Фармация» во всех районных центрах и г. Бресте для проведения самодиагностики ВИЧ.

Отбор контингентов для тестирования на ВИЧ проводится с большей настороженностью и более тщательно. Врачи всех специальностей ежегодно проходят спецучёбу по изучению нормативно-распорядительных документов, перечня медицинских показаний для тестирования на ВИЧ, его организации и проведению, порядку проведения дотестового и послетестового консультирования.

Важным индикатором возможного риска инфицирования ВИЧ при сексуальных контактах являются так же инфекции, передающиеся парентеральным и половым путём, поскольку они, во-первых, отражают поведенческие стереотипы, а во-вторых, являясь ко-фактором, увеличивают риск инфицирования ВИЧ.

Результаты и обсуждение. В ходе проведенных исследований обнаружен достаточно высокий удельный вес выявляемости ВИЧ-инфицированных, связанных с трудовой миграцией – пребыванием в Российской Федерации, Украине и других странах (2017 г. – 40 человек (23,5%); 9 месяцев 2018 г. – 17 человек (13,0%)).

Наблюдается «тенденция смещения» выявления ВИЧ-инфекции в возрастной группе 30 лет и старше от общего числа выявленных: $2016 \, \Gamma$. – $122 \, \text{человека}$ (73,9%); $2017 \, \Gamma$. – $134 \, (78,8\%)$; 9 месяцев $2018 \, \Gamma$. – $123 \, (82,0\%)$.

Если на начальных этапах развития эпидемического процесса по ВИЧ-инфекции превалирующим был путь передачи инфекции при инъекционном введении наркотических средств, при гомосексуальных контактах, неупорядоченных сексуальных связях, то в настоящее время преобладает инфицирование среди социально благополучных групп населения при гетеросексуальных контактах. По итогам

установлено в 2016 г. -83,6% случаев, в 2017 г. -80,6% случаев, за 9 месяцев 2018 г. -82,7% случаев с половым путем передачи (таблица 1).

Таблица 1. – Динамика регистрации гетеросексуального пути передачи ВИЧ

Голи	Количество случаев инфицирования	Доля от общего
Годы	ВИЧ при гетеросексуальных контактах	числа выявленных
2016	138	83,6%
2017	137	80,6%
9 мес. 2018	124	82,7%

Особенностями развития эпидпроцесса в области являются:

- Вовлечение в эпидемический процесс всех административных территорий области. Практически во всех городах и районах области в том или ином количестве регистрируются случаи ВИЧ-инфекции. Наибольшее количество случаев ВИЧ-инфекции зарегистрировано в городах: Пинск, Брест, Барановичи, Лунинецком районе, на которые приходится 70,5% заболеваемости.
- Стабильно высокий уровень заболеваемости ВИЧ-инфекцией в г. Пинске, который, продолжает оставаться самой неблагополучной территорией, кумулятивно зарегистрировано 859 случаев или 42,3% от всей заболеваемости в области.
- Увеличивается число лиц, живущих с ВИЧ/СПИД (1556 чел. по состоянию на 01.10.2018 показатель на 100 тысяч населения 112,3 (за 2017 г. 1455 чел., или 104,9 на 100 тысяч населения), что позволяет предполагать об эффективности проводимой антиретровирусной терапии.
- Рост числа инфицированных связанных с трудовой миграцией, с выездами граждан Брестской области на заработки в Российскую Федерацию, Украину.
- Вовлечение в эпидпроцесс социально-благополучных слоев населения, не относящиеся к группам повышенной уязвимости (ПИН, МСМ, ЖСБ).
- Увеличение числа выявляемых ВИЧ-инфицированных лиц в возрастной группе старше 30 лет. В возрасте 30 лет и старше выявлено 136 человек (80,0%), в том числе старше 40 лет 69 человек (40,1%), из них лиц пенсионного возраста 3 человека.
- Стабилизация удельного веса лиц, инфицировавшихся при инъекционном введении наркотических веществ (таблица 2).

Таблица 2. – Причины инфицирования ВИЧ

	Причины инфицирования		
Годы	сексуальные контакты	инъекционное	другие причины
		введение наркотиков	инфицирования
2015	77,5%	21,3%	1,3%
2016	84,2%	12,7%	3,0%
2017	84,1%	13,5%	2,4%
9 мес. 2018	84,4%	14,8%	0,7%

Несмотря на создание условий для укрепления репродуктивного здоровья и рождения здоровых детей ВИЧ-инфицированными матерями, 100% охватом тестированием на антитела к ВИЧ беременных, а также их половых партнеров, в области ежегодно регистрируются случаи вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции: $2016 \, \text{г.} - 3 \, \text{случая}$ (г. Пинск $-2 \, \text{случая}$, Дрогичинский р-н $-1 \, \text{случай}$), $2017 \, \text{г.} - 2 \, \text{случая}$ (по $1 \, \text{случаю} \, \text{в г.}$ Пинске и Ивановском районе), $9 \, \text{месяцев} \, 2018 \, \text{г.} - 1 \, \text{случай}$ (г. Брест).

Мониторинг за эпидситуацией по ВИЧ-инфекции осуществлялся путем проведения скрининга населения на ВИЧ. Отмечается ежегодное возрастание количества проводимых обследований (таблица 3).

Таблица 3. – Число исследований на ВИЧ в Брестской области

Годы	Число исследований
2016	184 400
2017	191 560
9 мес. 2018	150 632

Выводы. В Брестской области во исполнение Государственной программы «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016-2020 гг. реализуется комплекс мероприятий, направленных на предупреждение распространения ВИЧ-инфекции среди населения области. Однако, с учётом того, что развитие эпидемического процесса приобретает ряд характерных особенностей и претерпевает характерные изменения, следует продолжить работу по совершенствованию мониторинга и эпидскрининга за распространением ВИЧ-инфекции.

Очевидно, что необходимы целенаправленные усилия по профилактике передачи ВИЧ-инфекции, включающие ряд задач:

- совершенствование работы по дифференцированному отбору пациентов для скрининговых исследований по клиническим и эпидемиологическим показателям;
- расширение возможностей использования эксресс-тестов по крови в качестве первичного скринингового теста с применением их для обследований по эпидемиологическим, социальным показаниям, а также в практике врачей дерматовенерологов, акушер-гинекологов, урологов, наркологов, психиатров и др.;
- совершенствование качества кризисного консультирования, с проведением целенаправленной работы по привлечению к обследованию контактных лиц из очагов ВИЧ-инфекции;
- более широкое привлечение к обследованию пациентов из групп повышенной эпидемиологической значимости. При обследования беременных, по клиническим показаниям целесообразно использовать диагностические тест-системы не ниже 4-го, 5-го поколений;
- привлечение заинтересованных общественных организаций (РМОО «Встреча», ОО «Клуб деловых женщин», БОО «Позитивное движение», ОО «Матери против наркотиков» и др.) к проведению экспресс-тестирования на ВИЧ лиц из групп повышенной уязвимости.

Литература

- 1. Об участии Брестского областного центра гигиены и эпидемиологии и общественного здоровья в реализации проекта ПРООН «Профилактика и лечение ВИЧ/СПИД в Республике Беларусь / О.В. Арнаутов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Минск, 2009. Вып. 2. С. 41-43.
- 2. О проводимом мониторинге и эпидскрининге за распространением ВИЧ-инфекции на территории Брестской области / Н.Т. Гиндюк [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Минск, 2014. Вып. 7. С. 38-40.
- 3. Об организации мероприятий по профилактике вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции в Брестской области / О. В. Арнаутов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / под ред. Г.М. Игнатьева. Минск: Изд. В. Хурсик, 2010. С. 422-423.

MEASURES TO IMPROVE THE EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE FOR THE HIV INFECTION SPREAD IN THE BREST REGION TERRITORY

E.V. Ilyasheva, G.V. Sadovnikova, L.V. Glebko, L.N. Rudaya Brest Regional Centre of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Brest, Belarus

The epidemiological process on the spread of HIV infection is manifold and undergoing characteristic changes. Socio-economic, behavioral, demographic factors determine the pattern and rate of HIV infection spread. In the Brest region, Belarus, there is a high increase in the number of infected people associated with labor migration, with departures of citizens for work in the Russian Federation, Ukraine, involvement of socially prosperous population groups in the epidemiological process, which are not part of the increased vulnerability group (injecting drug users, homosexual contacts, etc.) Stably high HIV incidence is registered in cities Pinsk, Brest, Baranovichi, Luninets district, which account for 70.5% of the incidence.

Now the task of preventing HIV infection is one of the state policy priorities in the field of HIV/AIDS prevention. Despite a set of targeted preventive medical measures, there are objective difficulties in achieving the expected effectiveness associated with the characteristics of monitoring and epidemiological screening of the HIV infection spread. Taking into account the ongoing changes in the epidemiological process development, improvement and development of innovative approaches in the conduct of differentiated screening of the HIV infection spread are required.

Keywords: HIV infection, surveillance, prevention, Brest region, Belarus.

Поступила 14.11.2018

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА КРАСНУХИ ДЛЯ ДОКУМЕНТИРОВАНИЯ ПРОГРЕССА В ВЫПОЛНЕНИИ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КРАСНУХИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Е.О. Самойлович, Г.В. Семейко, М.А. Ермолович, Е.Ю. Свирчевская

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

Резюме. Молекулярный мониторинг циркуляции вируса краснухи предоставляет чрезвычайно важную информацию по выполнению программы элиминации этой инфекции. В течение 2004-2018 гг. в Республике Беларусь были секвенированы и генотипированы вирусы краснухи от 35 пациентов. Показано, что в период 2004-2006 гг. имела место эндемичная циркуляция вирусов краснухи трех генотипов клейда 1 – 1H, 1G и 1E, что подтверждалось высоким уровнем заболеваемости. Проводимые мероприятия по контролю инфекции (плановая иммунизация и дополнительные мероприятия по иммунизации) привели к снижению заболеваемости, которая начиная с 2007 г. находится на уровне менее случая на миллион молекулярных Эпидемиологические данные И результаты исследований свидетельствуют о том, что выявленные в последние 5 лет (2014-2018 гг.) вирусы краснухи являлись завозными (2014 г. – из Польши, 2015 г. – из Китая, 2017 г. – из Индонезии, 2018 г. – из Индии) и относились к различным генетическим вариантам генотипов 2В и 1Е. Полученные данные подтверждают отсутствие эндемичной передачи вируса краснухи на территории Республики Беларусь.

Ключевые слова: вирус краснухи, секвенирование, элиминация.

Введение. Выполнение молекулярного мониторинга циркуляции вируса краснухи является одной из важных функций Глобальной лабораторной сети ВОЗ по кори и краснухе. Результаты этих исследований позволяют получить информацию о генотипах, которые циркулировали в стране в предэлиминационный период, мониторировать циркулирующие генотипы, верифицировать отсутствие эндемичной циркуляции, обеспечить доказательства для верификации элиминации краснухи.

Генетическая характеристика вируса краснухи позволяет выделить две различных генетических группы (клейда) этого вируса. Нуклеотидные различия между клейдом 1 и клейдом 2 составляют 8-10%. По результатам филогенетического анализа участка Е1 гена вируса краснухи (739 н.о.), рекомендованного для генотипирования, выделяют 10 генотипов этого вируса в пределах клейда 1 и 3 генотипа в пределах клейда 2 [1]. Однако имеющиеся данные по циркулирующим генотипам вируса краснухи весьма ограничены, что вероятно, связано со сложностями работы с этим вирусом. В сравнении с вирусом кори, в отношении которого база данных ВОЗ MeaNS содержит информацию по нуклеотидным последовательностям более 44 000 штаммов, в отношении вируса краснухи в базу данных RubeNS представлена информация по нуклеотидным последовательностям 2 600 штаммов. В 2017 г. в базу данных MeaNS от Европейского региона ВОЗ были представлены данные о последовательностях генома вируса кори 3 343 пациентов [2], в базу данных RubeNS — о последовательностях генома вируса краснухи 11 пациентов [3].

Работа по генотипированию вируса краснухи в Республике Беларусь была начата в 2004 г., когда заболеваемость краснухой в стране составляла 45,82 на 100 000 населения (т.е. регистрировалось около 5 000 случаев инфекции в год), что позволило получить информацию по генотипам вируса краснухи, циркулирующим в стране в период их эндемичной циркуляции. Плановая иммунизация против краснухи (в 12 месяцев и 6 лет с использованием вакцины корь-паротит-краснуха) в 2005-2006 гг.

была дополнена кампанией иммунизации девочек и мальчиков в возрасте 11-19 лет моновалентной вакциной против краснухи, в рамках которой было привито более 1 млн человек, что кардинальным образом отразилась на заболеваемости. Начиная с 2007 г. в Республике Беларусь регистрируются единичные случаи краснухи [4]. Проводимые в последние годы исследования по мониторингу циркуляции вируса краснухи позволяют охарактеризовать имеющие место завозы вируса краснухи на территорию Республики Беларусь и доказать отсутствие его эндемичной циркуляции.

Целью настоящего исследования явилось обобщение опыта молекулярного мониторинга циркуляции вируса краснухи в Республике Беларусь для доказательства успешного выполнения программы элиминации краснухи.

Материалы и методы. В целях мониторинга циркуляции вируса краснухи выполняли обнаружение РНК вируса в клиническом материале (носоглоточный мазок, моча) в ОТ-ПЦР с последующим секвенированием. Выделение вирусной РНК из клинического материала или культуральной жидкости после пассирования материала в культуре клеток Vero проводили с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия). В период 2004-2013 гг. ОТ-ПЦР для выявления РНК вируса краснухи выполняли согласно протоколу, представленному Huebschen J.M. с соавт. [5], позднее для выявления РНК вируса краснухи использовали протокол СDС (Атланта, США), модифицированный нами. В соответствии с этим протоколом детекцию вируса краснухи проводили с помощью диагностической одностадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Реакцию выполняли с использованием коммерческого набора для одностадийной ОТ-ПЦР Superscript III One-Step qRT-PCR (Life Technologies, США). Для обнаружения РНК вируса краснухи использовали праймеры:

```
RV11 (прямой) 5'–CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC–3'; два обратных праймера: RV12-1 5'–CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA–3' и RV12-2 5'–CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG–3';
```

RV-Probe (зонд) 5'-FAM-AG GTC CAG GTC CCG CCC GAC-BHQ-3'.

Состав реакционной смеси объемом 25 мкл включал: 2X реакционную смесь, 10 пмоль каждого из праймеров, 5 пмоль зонда, 10 ед. ингибитора РНказ, 0,5 мкл Superscript III/Platinum Taq. Температурные условия обеих реакций: обратная транскрипция — 30 мин 48°C, активация ДНК-полимеразы — 5 мин 95°C, 40 циклов амплификации: 15 с 95°C / 1 мин 60°C. В качестве внутреннего контроля использовали рибонуклеазу Р (РНКаза Р), ее детекцию выполняли для каждой исследуемой пробы в параллельной реакции с олигонуклеотидами, предложенными Emery Sh. с соавт. [6].

В целях определения нуклеотидных последовательностей, амплифицированные фрагменты кДНК вырезали из геля, очищали с использованием набора «QIAEX II Gel Extraction Kit» (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, CIIIA) на капиллярном секвенаторе 3500 (Applied Biosystems, CIIIA).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Генотипирование вирусов кори и краснухи выполняли на основании анализа филогенетических взаимоотношений с референс-штаммами с помощью программы MEGA версии 6 [7]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограмм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

Результаты и обсуждение. В течение 2004-2018 гг. при вирусологическом обследовании пациентов с краснухой удалось генотипировать 35 вирусов краснухи.

В течении 2004-2006 гг., когда во всех регионах Республики Беларусь отмечалась высокая заболеваемость краснухой, фрагмент Е1 гена вируса краснухи был секвенирован для 31 пациента (для 29 пациентов – после предварительного пассирования вируса в культуре клеток Vero, для 2 – непосредственно из клинического материала). В 29 случаях это были пациенты с краснухой, в 2 случаях – дети с синдромом врожденной краснухи. Филогенетический анализ показал, что все выявленные вирусы краснухи принадлежали к клейду 1 и относились к 3 генотипам – 1H (18 штаммов), 1G (6 штаммов) и 1E (7 штаммов). Если в г. Минске и Минской области циркулировали вирусы всех трех генотипов, то в Витебской, Гродненской и Могилевской областях был обнаружен генотип 1Н, в Гомельской – генотип 1Е. Эндемичность циркуляции всех трех генотипов вируса краснухи подтверждалась продолжительностью их выделения и высоким уровнем заболеваемости (2004 г. – 45,82 на $100\ 000$, $2005\ \Gamma$. -38,64 на $100\ 000$, $2006\ \Gamma$. -24,39 на $100\ 000$). Информация о нуклеотидных последовательностях вирусов представлена в GenBank. Два белорусских вируса стали референс-штаммами для вирусов краснухи генотипа 1H и 1G при обновлении классификации вирусов краснухи (рисунок 1).

Начиная с 2007 г., после проведенных мероприятий по дополнительной иммунизации против краснухи в Республике Беларусь регистрируются единичные случаи этой инфекции. Заболеваемость снизилась до уровня 1 случай на миллион населения, за исключением 2011 г., когда было выявлено 20 заболевших краснухой, в том числе 10 иностранных граждан (9 граждан Вьетнама и 1 гражданин Китая), и с учетом заболевших иностранных граждан заболеваемость составила 2 на 1 000 000. В период 2007-2013 гг. все зарегистрированные случаи краснухи (41 случай: 2007 г. – 6, 2008 г. – 2, 2009 г. – 2, 2010 г. – 0, 2011 г. – 20, 2012 г. – 10, 2013 г. – 1) подтверждены выявлением IgM антител. От отдельных пациентов был получен материал для вирусологического исследования (носоглоточный соскоб, моча), для 8 пациентов удалось амплифицировать РНК вируса краснухи из клинического материала, однако концентрация была недостаточной для секвенирования.

В период 2014-2018 гг. в Республике Беларусь было зарегистрировано 5 случаев краснухи (по одному в 2014, 2015 и 2017 гг., и два – в 2018 г.). У всех заболевших выявлены IgM антитела в сыворотке крови и РНК вируса краснухи в носоглоточном соскобе и/или моче. Выполнено успешное секвенирование 4 вирусов краснухи (для 3 вирусов удалось секвенировать рекомендованные 739 н.о. Е1 гена, для одного – 371 н.о.). Эпидемиологические данные и результаты секвенирования показали, что все выявленные случаи краснухи являлись завозными. В 2014 и 2017 гг. заболели жители Республики Беларусь после возвращения из других стран (в 2014 г. – из Польши, в 2017 г. – из Индонезии), в 2015 и 2018 гг. заболели иностранные граждане, временно находившиеся в Республике Беларусь (2015 г. – студентка из Китая, 2018 г. – студентка и студент из Индии, имеющие тесный контакт друг с другом).

Выполненное секвенирование фрагмента E1 гена вирусов краснухи показало, что вирусы, импортированные из Польши в 2014 г., Китая – в 2015 г. и Индии в 2018 г. принадлежали к различным генетическим вариантам генотипа 2В (рисунок 2). Вирус, импортированный из Индонезии в 2017 г. принадлежал к генотипу 1Е (рисунок 3).

Информация о нуклеотидных последовательностях вирусов краснухи, импортированных в Республику Беларусь в 2014-2018 гг., была депонирована в базу данных BO3 RubeNS.

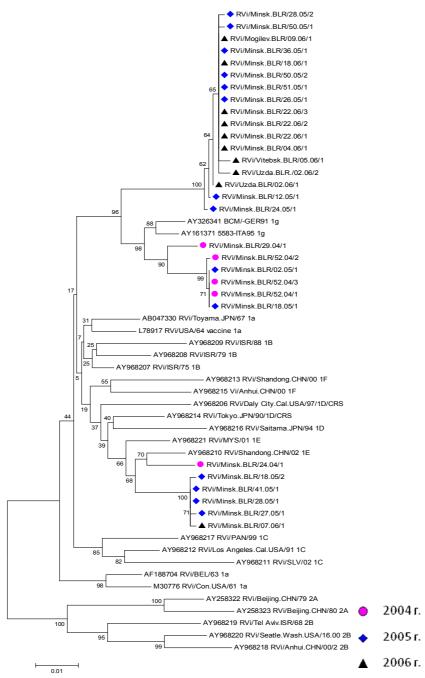


Рисунок 1. — Филогенетический анализ вирусов краснухи, циркулировавших в Беларуси в 2004-2006 гг.

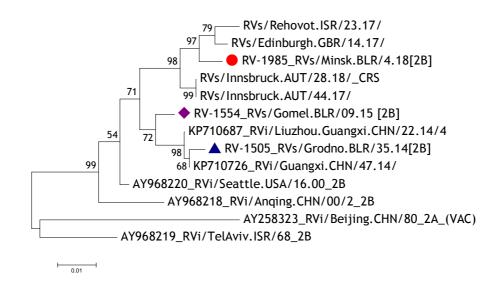


Рисунок 2. — Филогенетический анализ вирусов краснухи, импортированных в Республику Беларусь в 2014, 2015, 2018 гг. (739 н.о.)

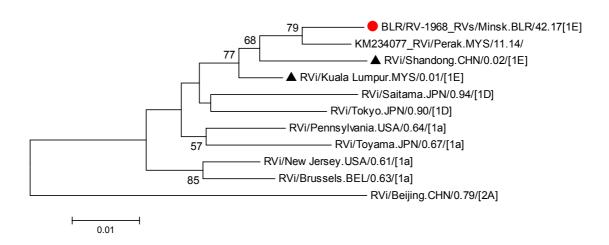


Рисунок 3. – Филогенетический анализ вируса краснухи, импортированного в Республику Беларусь в 2017 г. (371 н.о.)

Заключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что в начале 2000-х годов в Республике Беларусь отмечалась эндемичная циркуляция вирусов краснухи трех генотипов клейда 1 — 1H, 1G и 1E. Плановая иммунизация и дополнительные мероприятия по иммунизации привели к существенному снижению заболеваемости. В последние годы заболеваемость краснухой в Республике Беларусь находится на уровне менее 1 случая на миллион населения, что соответствует критерию элиминации инфекции. Результаты молекулярного мониторинга циркуляции вируса краснухи подтверждают, что практически ежегодно вирусы краснухи различных генетических вариантов завозятся на территорию Республики Беларусь, но эндемичная передача этого вируса отсутствует.

Литература

- 1. Status of global virologic surveillance for rubella viruses / E.S. Abernathy [et al.] // J. Infect. Dis. 2011. Vol. 204, suppl. 1. P. S524-S532.
- 2. База данных эпиднадзора за корью на основе определения нуклеотидных последовательностей (MeaNS) [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.who-measles.org/. Дата доступа: 20.11.2018.
- 3. База данных эпиднадзора за краснухой на основе определения нуклеотидных последовательностей (RubeNS) [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.who-rubella.org/. Дата доступа: 20.11.2018.
- 4. Самойлович, Е.О. Надзор за вакциноупраляемыми инфекциями в Республике Беларусь: соответствие международным стандартам / Е.О. Самойлович // Здравоохранение. -2014. -№ 6. C. 7-11.
- 5. Co-circulation of multiple rubella virus strains in Belarus forming novel genetic groups within clade 1 / J.M. Hübschen , M.A. Yermalovich, G.V. Semeiko [et al.] // J. Gen. Virol. -2007. Vol. 88, N 7. P. 1960-1966.
- 6. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus / S. L. Emery [et al.] // Emerg. Infect. Dis. 2004. Vol. 10, N 2. P. 311-316.
- 7. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725-2729.

RUBELLA VIRUS GENOTYPING IN DOCUMENTING OF PROGRESS IN IMPLEMENTING OF RUBELLA ELIMINATION PROGRAMME IN REPUBLIC OF BELARUS

E.O. Samoilovich, G.V. Semeiko, M.A. Yermalovich, E.Yu. Svirchevskaya Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Molecular monitoring of the rubella virus circulation provides extremely important information on the implementation of the program for the elimination of this infection. During 2004-2018 in the Republic of Belarus, rubella viruses from 35 patients were sequenced and genotyped. It was shown that in the period 2004–2006, there was an endemic circulation of rubella viruses of the three genotypes of 1-1H, 1G and 1E, which was confirmed by a high incidence rate. Conducted infection control activities (routine immunization and additional immunization activities) resulted in a decrease in the incidence rate, which since 2007 has been less than 1 case per million population. Epidemiological data and the results of molecular studies indicate that rubella viruses detected in the last 5 years (2014-2018) were imported (2014 – from Poland, 2015 – from China, 2017 – from Indonesia, 2018 – from India) and belonged to different genetic variants of genotypes 2B and 1E. The data obtained confirm the absence of endemic transmission of the rubella virus in the territory of the Republic of Belarus.

Keywords: rubella, sequencing, elimination.

Поступила 27.11.2018

ВИДОВОЙ СОСТАВ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ КРОВОСОСУЩИХ ЧЛЕНИСТОНОГИХ – ПЕРЕНОСЧИКОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ИНВАЗИЙ НА ТЕРРИТОРИИ БЕРЕЗИНСКОГО БИОСФЕРНОГО ЗАПОВЕДНИКА (БЕЛАРУСЬ)

Д.С. Сусло¹, М.М. Якович¹, Е.И. Бычкова¹, Т.В. Волкова¹, Л.М. Рустамова², А.Г. Красько², О.А. Фрейлихман³, Н.К. Токаревич³, О.Р. Князева², О.С. Залевская², В.Н. Шипуль², Ю.Б. Колтунова², Т.С. Старинская²

¹ГНПО «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам»; ²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь;

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В сообщении приводятся данные по фауне кровососущих членистоногих и выявленных в них видах возбудителей трансмиссивных инфекций и инвазий, зарегистрированных на территории Березинского биосферного заповедника.

Ключевые слова: иксодовые клещи, кровососущие комары, переносчики, возбудители, Березинский биосферный заповедник.

Введение. Березинский биосферный заповедник – это единственная в Республике особо охраняемая природная территория самого сохранившаяся практически в первозданном виде. Здесь создаются особые условия для сохранения и циркуляции возбудителей различной природы, ввиду насыщенности экосистем позвоночными и беспозвоночными животными – сочленами эпизоотических процессов. В связи с этим, на данной территории особый интерес представляет изучение кровососущих членистоногих (кровососущих комаров, иксодовых клещей) переносчиков возбудителей природно-очаговых болезней человека и животных. По исследованиям последних лет, на территории Беларуси из кровососущих комаров выделено 10 арбовирусных инфекций (вирусы клещевого энцефалита, Западного Нила, Синбис, Семлики, Укуниеми, Батаи, Тягиня, антиген вируса Инко и др.), 2 видов дирофилярий Dirofilaria repens (Railliet et Henry, 1911) и Dirofilaria immitis (Leidy, 1856) и др. [1, 2]. Иксодовые клещи представляют серьезную опасность для людей, являясь переносчиками возбудителей ряда природно-очаговых инфекций. Наибольшую опасность на территории Беларуси представляют клещи Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758), благодаря своей высокой численности, широкому распространению и агрессивному человеку. На территории Республики Беларусь у иксодид зарегистрировано носительство возбудителей 9 заболеваний вирусной и бактериальной природы (клещевого энцефалита, иксодовых клещевых боррелиозов и др.) [3]. Среди видов возбудителей, исследуемых в иксодовых клещах, заслуживает внимания высоко устойчивый во внешней среде Coxiella burnetii. В связи с широким распространением Cox. burnetii на пограничных с республикой территориях и существованием реальных предпосылок для расширения очагов коксиеллеза данное заболевание представляет важную медико-социальную проблему [4].

Проведение системного аналитического исследования по изучению роли переносчиков возбудителей трансмиссивных инфекций и инвазий, позволит установить круг эпидемически значимых видов кровососущих членистоногих, участвующих в циркуляции возбудителей трансмиссивных инфекций и инвазий на территории Беларуси.

Выявление случаев носительства одним кровососущим членистоногим одновременно нескольких возбудителей, представляет не только теоретический, но и практический интерес. Укус таким членистоногим человека может привести к более

тяжелому течению заболевания, требующего, по сравнению с моноинфекцией, длительной и дорогостоящей терапии.

Материалы и методы. Исследования фауны кровососущих комаров и иксодовых клещей были проведены в 2016-2017 гг. на территории Березинского биосферного заповедника (д. Крайцы, д. Кветча, д. Домжерицы Лепельского района Витебской области) в черноольховых, сосновых, еловых лесах и луговых биоценозах.

Сбор и учеты численности кровососущих комаров на различных фазах развития (имаго, личинки) проводили согласно общепринятым методикам [5, 6]. Определение видовой принадлежности кровососущих комаров проведено по А.В. Гуцевичу с соавтор. [5], Р.М. Горностаевой, А.В. Данилову [7], N. Вескег et al. [8]. Сборы и учеты численности иксодовых клещей проводились по общепринятым методикам [9].

Работы с биопробами проводили с соблюдением общепринятых мер предосторожности в соответствии с действующими ТНПА.

Все работы по анализу клещей на наличие ДНК возбудителей клещевых инфекций проводили в условиях стерильного бокса, используя стерильные инструменты, посуду и растворы.

Обработку биопробы из клещей осуществляли следующим образом: с использованием стерильного пинцета клеща помещали в чашку Петри, содержащую 70% этанол, промывали в течение 30-40 с, затем клеща перекладывали в чашку Петри с подложкой из фильтровальной бумаги для подсушивания, далее, обрабатывали в чашке с 96% этанолом, затем — стерильным физиологическим раствором и подсушивали на воздухе. После отмывки клеща помещали в пробирку типа эппендорф, с присвоением индивидуального учетного номера.

Гомогенизацию клещей осуществляли с использованием гомогенизатора с добавлением 50 мкл 1x фосфатно-солевого буфера, pH = 8,0.

Далее проводили исследования с целью выявления в биопробах боррелий и возбудителей анаплазмоза, эрлихиоза с использованием тест-системы «Белар-КИ-ПЦР/РВ», производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск) для идентификации возбудителей клещевых инфекций методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в соответствии с инструкцией производителя. Для выявления в биопробах *Cox. burnetii*, применяли набор реактивов для выявления ДНК *Cox. burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «*Coxiella burnetii Атр»*, производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург), в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ результатов амплификации в режиме реального времени проводили с помощью программного обеспечения используемого для амплификации прибора CFX96 Realtime system (Bio Rad, USA).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований на данной территории зарегистрировано 24 вида кровососущих комаров, относящихся к 5 родам: *Anopheles* (Meigen, 1818) – 1 вид; *Aedes* (Meigen, 1818) – 17 видов; *Culiseta* (Felt, 1904) – 3 вида; *Culex* (Linnaeus, 1758) – 2 вида; *Coquillettidia* (Dyar, 1905) – 1 вид. Впервые на территории Березинского биосферного заповедника, по сравнению с более ранними исследованиями [10], были зарегистрированы 4 вида – *Aedes sticticus* (Meigen, 1838); *Aedes pullatus* (Coquillett, 1904); *Culiseta morsitans* (Theobald, 1901); *Culex territans* (Walker, 1856).

В нападающем комплексе зарегистрировано 23 вида семейства *Culicidae*, из них доминирующие *A. punctor* (Kirby in Richardson, 1837); *A. sticticus*; *A. cinereus* (Meigen, 1818); *A. communis* (De Geer, 1776); субдоминантные – *A. cantans* (Meigen, 1818); *A. excrucians* (Walker, 1856); *A. intrudens* (Dyar, 1919); малочисленные – *A. annulipes*

(Meigen, 1830); A. vexans (Meigen, 1830); Cq. richiardii (Ficalbi, 1889); A. riparius (Dyar et Knab, 1907; 1913); редкие и локальные – A. flavescens (Muller, 1764); A. euedes (Howard, Dyar et Knab, 1913); A. diantaeus (Howard, Dyar et Knab, 1913); A. cataphylla (Dyar, 1916); Cs. Morsitans, Cx. pipiens pipiens (Linnaeus, 1758); An. maculipennis (Meigen, 1818); A. pullatus, A. cyprius (Ludlow, 1920); Cs. ochroptera (Peus, 1935); A. leucomelas (Meigen, 1804); Cs. alaskaensis (Ludlow, 1906) (рисунок 1).

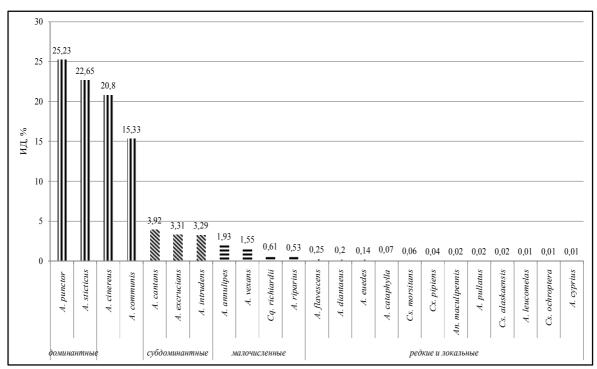


Рисунок 1. – Структура доминирования кровососущих комаров на стадии имаго на территории Березинского биосферного заповедника

В еловых лесах зарегистрирован 21 вид, в черноольховых лесах – 19 видов, в сосновых лесах – 16 видов, в луговых биоценозах – 9 видов. Для всех биотопов общими видов: A. cinereus, A. vexans, A. annulipes, A. cantans, A. excrucians, являются 9 A. communis. A. intrudens, A. punctor, A. sticticus. Наибольшая среднесезонная кровососущих комаров численность В нападающем комплексе отмечена черноольховых лесах – 35,8 экземпляров на учет.

На преимагинальных стадиях развития на территории Березинского биосферного заповедника зарегистрировано 19 видов кровососущих комаров, из них доминирующие -A. annulipes, A. cantans, A. intrudens, субдоминантные -A. cinereus, An. maculipennis, A. sticticus, Cx. territans, A. communis, A. punctor, A. leucomelas, A. cataphylla, A. flavescens, малочисленные -A. vexans, редкие и локальные -A. riparius, A. excrucians, A. cyprius, A. euedes, Cs. alaskaensis, Cs. morsitans.

Наибольшее видовое разнообразие -16 видов, и самый высокий показатель средней плотности личинок в водоемах 64,5 экз/м² зарегистрированы в весенний период сборов, за счет одновременного выплода моноцикличных и полицикличных видов. Минимальные и максимальные значения плотности личинок в водоемах весной находятся в пределах от 10,0 до 470,0 экз/м². В летний период сборов зарегистрировано 10 видов личинок кровососущих комаров со средней плотностью личинок 51,9 экз/м², осенью показатель средней плотности личинок сократился до 2,5 экз/м².

Кровососущие комары, собранные на территории Березинского биосферного заповедника, были исследованы молекулярно-генетическими методами на наличие РНК вируса Западного Нила (ЗН) и ДНК микрофилярий. Впервые для территории Беларуси РНК вируса ЗН зарегистрирована в комарах *А. punctor*, *A. sticticus*, *A. intrudens*, *A. communis* (0,20% от всех исследованных кулицид) и ДНК микрофилярий – в комарах: *A. cinereus*, *A. punctor*, *A. cantans*, *A. sticticus*, *A. intrudens* (0,23% от всех исследованных). Микстзараженность отмечена для 3 видов (*A. punctor*, *A. sticticus*, *A. intrudens*). Возбудитель туляремии в кровососущих комарах не выявлен.

В результате проведенных исследований в 2016-2017 гг. в различных типах биотопов при сборах с растительности на территории Березинского биосферного заповедника зарегистрировано два вида иксодовых клещей: *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794). При этом *I. ricinus* регистрировался во всех исследуемых биотопах и доминировал во всех сборах (84,4% от общего количества собранных клещей). Следует отметить, что в сборах было отмечено 6,7% нимф *I. ricinus*.

Анализ численности клещей *I. ricinus* в различных типах биотопов показал, что минимальные значения данного показателя отмечены в сухих сосновых лесах — 1,5 экземпляров на флаго/км (экз. на флаго/км). Данный тип биотопа характеризуется отсутствием условий для образования стабильной популяции клещей. Отсутствует подрост, большая часть территории состоит из мест подверженных высокой инсоляции. Самая высокая численность иксодовых клещей зарегистрирована в еловых лесах (28 экз. на флаго/км). Данная территория характеризуется наличием благоприятных условий для нормальной жизнедеятельности и поддержания популяции иксодовых клещей (хорошо развит кустарниковый ярус, где создаются необходимые условия для обитания и развития клещей, а также наличие большого количества животных — прокормителей иксодид).

В сосновых и еловых лесах отмечено наличие одного вида иксодовых клещей — $I.\ ricinus$ со средней относительной численностью 5,8 экз. на флаго/км и 24 экз. на флаго/км, соответственно. Что касается луговых биоценозов, то в данном типе биотопов отмечено наличие двух видов иксодовых клещей — $I.\ ricinus$ и $D.\ reticulatus$ с относительной численностью 16,5 экз. на флаго/км. Соотношение видов $I.\ ricinus$ и $D.\ reticulatus$ — 1:2. Данный тип биотопа наиболее характерен для обитания $D.\ reticulatus$. Несмотря на существующее предположение о том, что $D.\ reticulatus$ не участвует в передаче возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов, а является лишь его хранителем, нельзя однозначно исключить этот вид иксодовых клещей при рассмотрении трансмиссии клещевых инфекций на природных территориях. В черноольшаниках зарегистрирован один вид — $I.\ ricinus$ с относительной численностью 9 экз. на флаго/км.

Иксодовые клещи, собранные на территории Березинского биосферного заповедника, были исследованы молекулярно-генетическими методами на наличие ДНК возбудителей клещевых инфекций: спирохет комплекса Borrelia burgdorferi sensu lato, эрлихий, анаплазм, Coxiella burnetii. В результате исследований ДНК спирохет комплекса B. burgdorferi s.l. выявлена у 37,8% иксодид двух видов (I. ricinus — у 40,7% исследованных клещей, D. reticulatus — у 21,4%). ДНК Anaplasma phagocytophilum отмечены также у двух видов в 15,6% клещей (I. ricinus — у 17,1% исследованных клещей, D. reticulatus — у 7,1%). ДНК Ehrlichia muris выявлены у одного вида — I. ricinus (2,6% иксодид) (рисунок 2). ДНК Cox. burnetii в исследованных образцах не выявлена. Следует отметить, что у 7,9% клещей I. ricinus были отмечены микст-инфекции (B. burgdorferi s.l. + A. phagocytophilum).

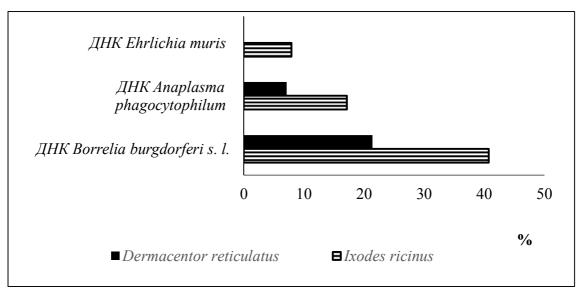


Рисунок 2. – Наличие ДНК возбудителей клещевых инфекций (в %) у иксодовых клещей, собранных на территории Березинского биосферного заповедника

Заключение. На территории Березинского биосферного заповедника зарегистрировано 24 вида кровососущих комаров на различных стадиях развития (на стадии имаго — 23 вида, на преимагинальных стадиях — 19), 4 вида зарегистрированы впервые (A. sticticus, A. pullatus, Cs. morsitans, Cx. territans). Впервые для территории Беларуси РНК вируса 3H зарегистрирована в комарах A. punctor, A. sticticus, A. intrudens, A. communis (0,20% от всех исследованных кулицид) и ДНК микрофилярий — в комарах: A. cinereus, A. punctor, A. cantans, A. sticticus, A. intrudens (0,23% от всех исследованных). Микст-инфекции отмечены для 3 видов (A. punctor, A. sticticus, A. intrudens).

На данной территории в сборах с растительности зарегистрировано два вида иксодовых клещей $Ixodes\ ricinus\$ и $Dermacentor\ reticulatus\$. При этом $I.\ ricinus\$ регистрировался во всех исследуемых биотопах и доминировал во всех сборах (84,4 % от общего количества собранных клещей).

В результате исследований ДНК спирохет комплекса B. burgdorferi s.l. выявлена у 37,8% иксодид двух видов (I. ricinus – у 40,7% исследованных клещей, D. reticulatus – у 21,4%). ДНК Anaplasma phagocytophilum отмечены также у двух видов в 15,6% клещей (I. ricinus – у 17,1% исследованных клещей, D. reticulatus – у 7,1%). ДНК Ehrlichia muris выявлены у одного вида – I. ricinus (2,6% иксодид). Возбудитель Ку-лихорадки Coxiella burnetii в исследованных иксодовых клещах, собранных на территории Березинского биосферного заповедника не обнаружен. У 7,9% клещей I. ricinus выявлено смешанное инфицирование (B. burgdorferi s.l. + A. phagocytophilum).

Литература

- 1. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в Республике Беларусь (полевые и экспериментальные исследования): автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06; 14.00.30 / Т.И. Самойлова; ГУ НИИ эпидемиол. и микробиол. М-ва здравоохр. Респ. Беларусь. Минск, 2003. 41 с.
- 2. Detection of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA in mosquitoes from Belarus / T. Volkova [et. al.] // Parasitol. Res. 2016. Vol. 115, N 9. P. 3535-3541.
- 3. Организм иксодовых клещей (ACARINA, IXODIDAE) как среда обитания биоразнообразия патогенных агентов / Н.П. Мишаева [и др.] // Современные аспекты

патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики паразитарных заболеваний / под ред. проф. В.Я. Бекиша. – Витебск: ВГМУ, 2014. – С. 140-143.

- 4. Anthropogenic effects on changing of Q-fever epidemiology in Russia / N. Tokarevich [et. al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. Vol. 1078. P. 120-123.
- 5. Гуцевич, А.В. Фауна СССР. Насекомые двукрылые / А.В. Гуцевич, А.С. Мончадский, А.А. Штакельберг. Л.: Наука, 1970. 384 с.
- 6. Методы сбора и учета кровососущих двукрылых насекомых (Обзорная информация) / М.Н. Трухан [и др.]. М.: БелНИИНТИ Госэкономплана Респ. Беларусь, 1991.-36 с.
- 7. Горностаева, Р.М. Комары Москвы и Московской области / Р.М. Горностаева, А.В. Данилов. Москва: КМК Scintific Press, 1999. 342 с.
- 8. Mosquitoes and their control / N. Becker [et al.]. -2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010.-608 pp.
- 9. Филиппова, Н.А. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (*Acarina, Ixodidae*). Морфология, систематика, экология, медицинское значение / Н.А. Филиппова. Л.: Наука, 1985.-416 с.
- 10. Трухан, М.Н. Кровососущие комары (*Diptera, Culicidae*) / М.Н. Трухан // Фауна и экология насекомых Березинского заповедника : сб. науч. ст. / Ин-т зоол. АН БССР; под ред. Л.М. Сущени. Минск, 1991. С. 54-79.

SPECIES COMPOSITION AND DISTRIBUTION OF BLOODSUCKING ARTHROPODS – VECTORS OF TRANSMISSIBLE INFECTIONS AND INVASIONS ON THE TERRITORY OF BEREZINSKY BIOSPHERE RESERVE (BELARUS)

D.S. Suslo¹, M.M. Yakovich¹, E.I. Bychkova¹, T.V. Volkova¹, L.M. Rustamova², A.G. Krasko², O.A. Freilikhman³, N.K. Tokarevich³, O.R. Kniazeva², O.S. Zalevskaya², V.N. Kosolapova², Yu.B. Koltunova², T.S. Starinskaya²

¹State Scientific and Production Association "Scientific Research Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Bioresources";

²Republican Research & Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus;

³Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

The report provides data on the fauna of bloodsucking arthropods registered on the territory of Berezinsky Biosphere Reserve and species of pathogens of transmissible infections and invasions found in them.

Keywords: ticks, mosquitoes, species, carriers, pathogens, Berezinsky Biosphere Reserve, Belarus.

Поступила 27.11.2018

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ И АНТРОПУРГИЧЕСКИХ ОЧАГОВ ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ И ИЕРСИНИОЗОВ, НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Е.П. Счеслёнок¹, П.А. Семижон¹, Е.Г. Фомина¹, Е.Ю. Бурдейко¹, Н.А. Дубков¹, А.С. Владыко¹, Е.В. Федорович², С.А. Бусел², Н.Л. Автухова³, Т.В. Якусевич⁴, О.Г. Омельянович⁵, Т.В. Науменко⁶, Н.В. Овеснова⁷, Е.С. Селькина⁸

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск;
²ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск;
³УЗ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск;
⁴ГУ «Гродненский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
Гродно; ⁵УЗ «Могилёвский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Могилёв; ⁶ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Гомель; ⁷ГУ «Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Витебск; ⁸ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Брест, Беларусь

Резюме. С использованием молекулярно-биологических методов проведено исследование циркуляции возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) и иерсиниозов среди мелких грызунов, обитающих в очагах распространения инфекций на территориях административных регионов (областей) Республики Беларусь. Выявлен достаточно высокий уровень инфицированности грызунов возбудителями ГЛПС (5,2%) и иерсиниозов (13,0%). Показано, что возбудители ГЛПС и иерсиниозов имеют общих носителей в очагах распространения. циркуляция возбудителей И Одновременная ГЛПС иерсиниозов охарактеризовать очаги распространения как инфекционные территориальносочетанные, а по виду сочетанности как бактериально-вирусные. Показано, что значительную часть от общего количества грызунов, инфицированных возбудителями ГЛПС (половина) и иерсиниозов (порядка одной трети), составляют синантропные грызуны.

Ключевые слова: зоонозные инфекции, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), иерсиниоз, природные и антропургические очаги распространения инфекций, инфицированность мелких грызунов.

Введение. Природно-очаговые инфекции представляют собой серьезную проблему для практического здравоохранения республики. Учитывая то, что в настоящее время в Республике Беларусь отмечается изменение климатических условий (в сторону потепления), значительно увеличился естественный рост численности природных хозяев – мышевидных грызунов, являющихся переносчиками и источником инфицирования человека. Заболеваемость населения природно-очаговыми инфекциями постоянно находится в сфере внимания практического здравоохранения. Согласно последним данным по инфекционной заболеваемости в Республике Беларусь в 2017 г. было зарегистрировано 65 случаев геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), что составило 0,69 случая на 100 тыс. населения и 48 случаев иерсиниозной инфекции: 40 случаев энтерита, вызванного Yersinia enterocolitica (0,41 случая на 100 тыс. населения) [1]. Антропогенное и техногенное воздействие на окружающую среду приводит к изменению биоценотической структуры очагов распространения инфекций, что может повысить степень эпидемической опасности.

Изучение сочетанности природных очагов зоонозных инфекций является актуальной проблемой в области здравоохранения. Особенностью сочетанных очагов является общность биоценоза для популяций возбудителей различной этиологии (бактерии, вирусы, паразитарные инфекции) и формирование ими природных очагов. Существуют очаги различных типов, где циркулируют возбудители туляремии, ГЛПС, лептоспироза, листериоза, иерсиниозов. По степени сочетанности природные очаги этих инфекций имеют общих носителей возбудителя в биоценотической среде: обыкновенной, рыжей, красной полевок, желтогорлой, полевой, лесной и домовой мышей, серой крысы, обыкновенной и малой бурозубок [2]. В настоящее время наблюдается формирование новых природных очагов под влиянием антропогенных и климатических факторов; изменение биоценотической структуры природных очагов; формирование природных инфекционных заболеваний очагов сочетанных бактериальной и вирусной этиологии.

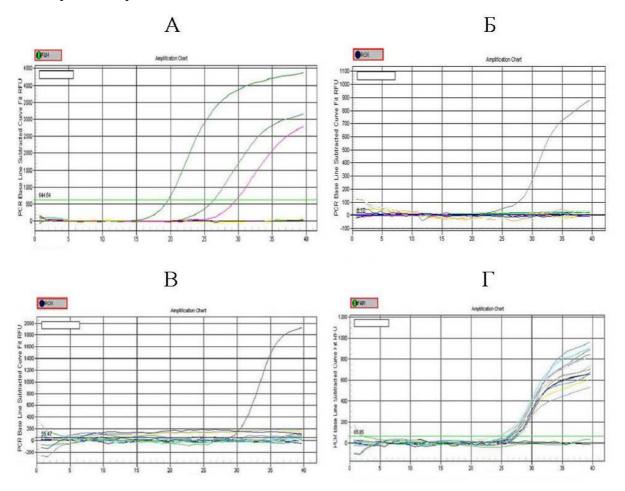
Цель исследования: определение циркуляции возбудителей ГЛПС и иерсиниозов среди мелких грызунов, обитающих в очагах распространения инфекций на территориях административных регионов Республики Беларусь.

Материалы и методы. В периоды март-май 2017 и 2018 гг., а также августоктябрь 2017 г. в природных и антропургических очагах на территориях всех областей республики были отловлены мелкие грызуны следующих видов: рыжая полёвка, желтогорлая мышь, лесная мышь, полёвка обыкновенная, домовая мышь, полевая мышь, крыса серая, полёвка-экономка, бурозубка, крыса черная, кутора обыкновенная. Для оценки инфицированности отловленных особей мелких грызунов возбудителями ГЛПС и иерсиниозов были получены пробы легких [3] и пробы кишечника грызунов [4], соответственно. Все анализируемые пробы кишечника выдерживали при температуре +4°C – +8°C в течение 14 суток с целью подроста иерсиний, обладающих психрофильными свойствами – «холодовое обогащение» (XO). Анализ проб на наличие ДНК иерсиний проводили на 7 и 14 сутки после ХО. Для выявления и идентификации возбудителей иерсиниозов использовали тест-систему *Y. ps./Y. ent.*-ПЦР/РВ» (Беларусь), позволяющую нтвина Y. pseudotuberculosis и Y. enterocolitica методом ПЦР в режиме реального времени. Тест-система «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» (Беларусь) была использована одновременного выявления РНК возбудителей ГЛПС – вирусов Пуумала, Добрава и Хантаан в пробах легких отловленных особей. Для выделения РНК/ДНК из использовали набор «РИБО-преп» анализируемого материала производства реакции «АмплиСенс» (Российская Федерация). Для постановки обратной «Реверта-L» транскрипции использовали набор производства «АмплиСенс» (Российская Федерация).

Результаты и обсуждение. С целью проведения эпизоотологического обследования природных и антропургических очагов ГЛПС специалистами зоогрупп центров гигиены и эпидемиологии проведён отлов грызунов для учета их численности и последующего лабораторного исследования на наличие у них хантавирусного антигена. Были получены 576 проб лёгких органов грызунов, в том числе: Минская область — 209; Могилёвская область — 200; Гродненская область — 64; Гомельская область — 50; Брестская область — 30; Витебская область — 23.

Метод ОТ-ПЦР был использован для проведения исследований по определению инфицированности возбудителями ГЛПС мелких грызунов — хронических носителей хантавирусов. Анализ органов (легкие) грызунов проводили с использованием тестсистемы для идентификации возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ». Данная тест-система позволяет

одновременно выявлять РНК вирусов Пуумала, Добрава и Хантаан в исследуемом материале. На рисунке 1 представлен результат постановки ПЦР на матрице РНК, выделенной из суспензии легких грызунов, отловленных на территории Славгородского района Могилевской области.



A, Б – амплификация с использованием ПЦР-смеси-1/PUU/HANT, каналы FAM и ROX соответственно); В, Γ – амплификация с использованием ПЦР-смеси-2/DOB/BKO (каналы ROX и FAM, соответственно)

Рисунок 1. – Результат ПЦР-анализа проб легких грызунов, отловленных на территории Славгородского района

В результате постановки ПЦР в режиме реального времени по каналу FAM (рисунок 1A) регистрируется продукт специфической амплификации в виде кривых флюоресценции. Специфическая амплификация отмечается в контрольных образцах: ПКО/РUU и К^{+PUU} ОТ-ПЦР, что свидетельствует о прохождении всех стадий ОТ-ПЦР, и только в одной пробе из 12 анализируемых, что свидетельствует о наличии в данной пробе генетического материала вируса Пуумала; по каналу ROX (рисунок 1Б) регистрируется продукт специфической амплификации для контрольного образца ПКО/НАNТ. В результате амплификации с использованием ПЦР-смеси-2/DOB/ВКО по каналу FAM во всех анализируемых пробах регистрируется продукт специфической амплификации на матрице внутреннего контрольного образца (контроль выделения), который был добавлен в пробы на стадии выделения РНК из суспензии легких грызунов (рисунок 1Г). Из рисунка 1В видно, что по каналу ROX регистрируется

продукт специфической амплификации в виде кривой флюоресценции только на матрице контрольного образца – ПКО/DOB. Таким образом, из 12 проанализированных проб органов грызунов, отловленных на территории Славгородского района, только в одной пробе была выявлена РНК возбудителя ГЛПС – РНК вируса Пуумала.

Аналогичным образом были проанализированы все пробы органов грызунов. В результате анализа 576 проб (легкие) отловленных особей грызунов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в 30 пробах (5,2%) выявлена РНК возбудителя ГЛПС: в 24 (80%) – РНК вируса Пуумала и в 6 (20%) - РНК вируса Добрава. Вирус Пуумала был выявлен на административных территориях всех областей республики, что свидетельствует о его повсеместном распространении. Отмечается циркуляция вируса Добрава в Могилёвской области, выявленного на территории данного региона в 2016 г. [5]. Впервые диагностирован вирус Добрава на территориях Минской (Солигорский район), Гродненской (Островецкий район) и Гомельской (Жлобинский район) областей. Шесть видов грызунов: желтогорлая мышь, рыжая полёвка, полевая мышь, полёвка-экономка, домовая мышь, крыса серая являлись носителями хантавирусов — возбудителей ГЛПС. На рисунке 2 представлены данные по выделению возбудителей ГЛПС в очагах распространения на территориях административных регионов Республики Беларусь.

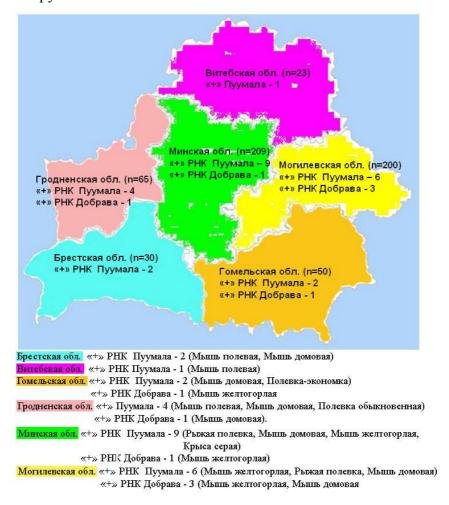


Рисунок 2. — Результат анализа проб органов грызунов, обитающих в очагах распространения ГЛПС, на территориях административных регионов Республики Беларусь

В результате исследования 330 проб органов (кишечник) грызунов методом ПЦР в режиме реального времени была выявлена ДНК иерсиний в 43 (13,0%) пробах, из них в 24 (55,8%) пробах идентифицирована ДНК *У. enterocolitica* и в 19 (44,2%) – ДНК *У. pseudotuberculosis*. Из 11 исследуемых видов грызунов 10 являлись носителями возбудителей иерсиниозов: рыжая полёвка, желтогорлая мышь, домовая мышь, серая крыса, черная крыса, обыкновенная полёвка, полёвка-экономка, мышь лесная, полевая мышь, бурозубка. В одном случае была обнаружена микст-инфекция – в одной особи (крыса серая) были выявлены РНК вируса Пуумала и ДНК *У. pseudotuberculosis*. В таблице 1 представлены результаты анализа проб органов (кишечник) мелких грызунов, отловленных в очагах распространения на территориях административных регионов Республики Беларусь, методом ПЦР в режиме реального времени.

Таблица 1. – Результат анализа проб органов (кишечник) грызунов методом ПЦР

N₂	Параметр	Административные регионы Республики Беларусь (области)								
112		Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	Минская	Могилевская			
1.	Количество									
	проанализированных	30	23	50	64	133	30			
	проб									
2.	Инфицированность	10,0	8,7	6,0	18,8	15,0	10,0			
	грызунов (%)	10,0	0,7	0,0	10,0	15,0	10,0			
3.	Результат ПЦР – ДНК									
	Y. enterocolitica и	3	2	3	12	20	3			
	Y. pseudotuberculosis	J	_	5	12	_0				
	(количество проб)									
4.	Выявлена ДНК	•	4	•		10				
	Y. enterocolitica	2	1	2	9	10	-			
	(количество проб)									
5.	Источник выделения									
	ДНК Y. enterocolitica:									
	мышь домовая	1	-	1	-	2	-			
	мышь полевая	-	-	1	2	-	-			
	рыжая полёвка	1	-	-	-	1	-			
	полевка-экономка	-	1	-	3	-	-			
	обыкновенная полёвка	-	-	-	2	-	-			
	желтогорлая мышь	-	-	-	1	4	-			
	крыса серая	-	-	-	-	2	-			
	крыса черная	-	-	-	-	1	-			
	бурозубка	-	-	-	1	-	-			
	Выявлена ДНК		4			10				
	Y. pseudotuberculosis	1	1	1	3	10	3			
	(количество проб)									
6.	Источник выделения									
	ДНК V									
7.	Y. pseudotuberculosis:	1		1		3				
/.	мышь домовая	1	-	1	- 1	1	2			
	мышь полевая	-	- 1	-	1		_			
	рыжая полёвка	-	-	-	-	-	-			
	полевка-экономка	-	-	-	1	2	-			
	обыкновенная полёвка	-	-	-	-	1	- 1			
	желтогорлая мышь	-	-	-	-		1			
	мышь лесная	-	-	-	-	1 2	-			
	крыса серая	-	-	-	-		-			

Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что возбудители ГЛПС (вирусная инфекция) и возбудители иерсиниозов (бактериальная инфекция) имеют общих носителей в очагах распространения: желтогорлая мышь, рыжая полёвка, полевая мышь, полёвка-экономка, домовая мышь, крыса серая. Общие носители и одновременная циркуляция возбудителей ГЛПС и иерсиниозов (в 4-х районах Минской области и в 2-х районах Гродненской области) позволяют охарактеризовать исследуемые очаги распространения как инфекционные территориально-сочетанные и по виду сочетанности как бактериально-вирусные (рисунок 3).

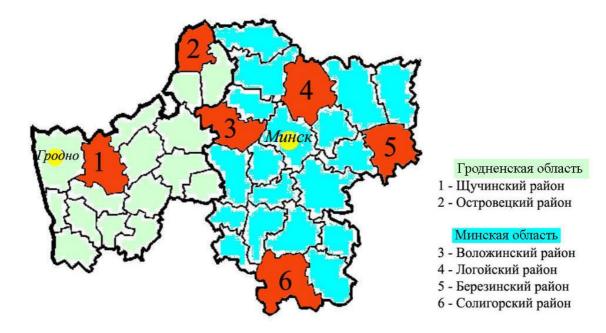


Рисунок 3. — Сочетанные очаги распространения ГЛПС и иерсиниозов на территориях Гродненской и Минской областей

Заключение. Молекулярно-биологический анализ проб органов (легкие, кишечник) грызунов, отловленных в очагах распространения на территориях административных регионов Республики Беларусь, выявил достаточно высокий уровень инфицированности грызунов возбудителями ГЛПС (5,2%) и иерсиниозов (13,0%). Показано, что вирус Пуумала является основным возбудителем ГЛПС, циркулирующим на территории Республики Беларусь. В то же время вирус Добрава выявлен к настоящему времени на территории четырех областей республики, что свидетельствует о расширении ареала данного возбудителя ГЛПС. Выявлены сочетанные очаги распространения инфекций.

Антропогенное и техногенное воздействие на окружающую среду приводит к изменению биоценотической структуры очагов распространения инфекций, что может повысить степень эпидемической опасности. Также повышается участие синантропных грызунов в эпидемическом процессе. Показано, что синантропные грызуны (3 серых крысы и 12 домовых мышей) составляют половину от общего количества грызунов (30), инфицированных возбудителями ГЛПС. Подобная тенденция наблюдается и при анализе носителей возбудителей иерсиниозов: ДНК возбудителей иерсиниозов выявлена в 14 пробах кишечника отловленных особей синантропных грызунов (крыса серая – 4, крыса черная – 1 и домовая мышь – 9), что составляет третью часть от общего количества инфицированных грызунов.

Литература

- 1. Справка о движении инфекционных заболеваний по республике (все население) за 2017 г. Минск: РЦГиОЗ, 2017. Табл. № 2А.
- 2. Демидова, Т.Н. Сочетанность природных очагов туляремии и геморрагической лихорадки с почечным синдромом на территории Российской Федерации в 2004-2008 гг. / Т.Н. Демидова, Т.В. Михайлова // Национальные приоритеты России. 2009. № 2. С. 34-35.
- 3. Лабораторная диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом [Электронный ресурс]: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 24.12.2010 № 116-1210. Режим доступа: http://med.by/methods/pdf/116-1210.pdf. Дата доступа: 16.11.2018.
- 4. Лабораторная диагностика псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 19.03.2010 № 076-0210.
- 5. Хантавирусы, циркулирующие на территории Республики Беларусь / Е.П. Счеслёнок [и др.] // Молекулярная диагностика 2017: сб. тр. IX Всерос. науч.практ. конф. с междунар. участием. М., 2017. Т. 2 С. 350-351.

MOLECULAR BIOLOGY ANALYSIS OF NATURAL FOCI AND ANTHROPURGIC FOCI OF ZOONOSES CAUSED BY THE HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME CAUSATIVE AGENTS AND THE YERSINIOSIS CAUSATIVE AGENTS ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

E.P. Scheslenok¹, P.A. Semizhon¹, E.G. Fomina¹, E.Y. Burdeyko¹, N.A. Dubkov¹,
A.S. Vladyko¹, E.V. Fedorovich², S.A. Busel², N.L. Avtuhova³, T.V. Yakusevich⁴,
O.G. Omelyanovich⁵, T.D. Naumenko⁶, N.V. Ovesnova⁷, E.S. Selkina⁸

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk; ²Republican
Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk; ³Minsk Region Center of Hygiene,
Epidemiology & Public Health, Minsk; ⁴Grodno Region Center for Hygiene, Epidemiology & Public
Health, Grodno; ⁵Mogilev Region Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Mogilev;
⁶Gomel Region Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Gomel; ⁷Vitebsk Region Center
for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Vitebsk; ⁸Brest Region Center for Hygiene, Epidemiology
& Public Health, Brest, Belarus

The circulation of causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and yersiniosis among rodent hosts was studied using molecular biology techniques. The material was obtained from the natural foci in the administrative regions of the Republic of Belarus. The significant rodent infection level with the HFRS causative agents (5.2%) and the yersiniosis causative agents (13.0%) was revealed. The simultaneous circulation of the causative agents allows characterizing these foci as viral-bacterial combined. It was shown that significant part of rodents infected with the HFRS causative agents (about half) and the yersiniosis causative agents (about one third) are synanthropic rodents.

Keywords: zoonoses, (HFRS), yersiniosis, natural foci and anthropurgic foci of infection spread, infected rodents.

Поступила 15.11.2018

МИКРОБИОЛОГИЯ

Обзорные сообщения

ТРИПСИНПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПЕРИОДОНТИТА

С.В. Ткачев 1 , Л.Н. Дедова 2 , О.С. Городецкая 2 , П.А. Семижон 1

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Реферат. В статье представлен краткий обзор литературы, посвященный использованию оценки трипсиноподобной активности *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* в лабораторной диагностике генерализованного периодонтита. Данный тест помогает прогнозировать стабилизацию или развитие генерализованного периодонтита, выявляет заболевание до проявления выраженных воспалительно-деструктивных признаков, а также определяет роль периопатогенов в прогрессировании заболевания.

Ключевые слова: периодонтит, грамотрицательные анаэробные бактерии, трипсиноподобная активность, N-α-бензоил-DL-аргинин-2-нафтиламид.

Периодонтит определяют, как воспалительное заболевание тканей периодонта, сопровождающееся деструкцией периодонтальной связки и альвеолярной кости. Ведущая роль в формировании воспалительного процесса в ротовой полости принадлежит резидентной облигатной анаэробной и микроаэрофильной микрофлоре. К агентам, индуцирующим длительные воспалительно-деструктивные процессы в тканях периодонта, обычно относят бактерии Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus), Treponema denticola, Porphyromonas gingivalis, Haemophilus actinomycetemcomitans (Actinobacillus actinomycetemcomitans), Prevotella intermedia и др. [1-3].

Распространенность генерализованного периодонтита среди жителей Европы составляет более 50% и увеличивается в возрасте 60-65 лет до 70-85% [4]. В 1996 г. в Беларуси было проведено эпидемиологическое исследование стоматологического здоровья и тенденций заболеваемости в соответствии с рекомендациями ВОЗ (использовалась методика системной групповой выборки, включающая ключевые возрастные группы населения). Болезни периодонта были выявлены у 99,8% взрослого населения [5]. В период с 2005 по 2006 г.г. в Беларуси распространенность болезней периодонта в возрастной группе 35-44 года составляла 92,5 ± 1,27% [6].

Болезни периодонта являются фактором риска в развитии системных заболеваний, а также могут повлиять на течение беременности, сахарного диабета, сердечно-сосудистых, легочных и других заболеваний [3, 7]. Патогенетический потенциал периодонтита объясняют рефлекторным, аллергическим, аутоиммунным механизмами, гноетечением, низким уровнем иммунологической реактивности организма человека, токсемией, эндотоксинами [3].

Традиционная диагностика болезней периодонта базируется на клиническом стоматологическом осмотре и мониторинге таких объективных тестов, как гигиенический статус ротовой полости, глубина зондирования периодонтального кармана, гингивальные индексы, оценка уровня эпителиального прикрепления, кровоточивость десны, оценка состояния микроциркуляции, а также

рентгенологическом исследовании [3]. Однако классическое клиническое обследование описывает только историю болезни и обладает ограниченным прогностическим потенциалом. Кроме того, для постановки диагноза на основании клинических признаков болезни, поражение тканей должно быть достаточно выраженным, то есть существует вероятность запоздалого диагноза. Следовательно, для выбора правильной и своевременной стратегии лечения необходим поиск методов, позволяющих диагностировать периодонтит легкой степени тяжести (до выраженных воспалительнодеструктивных изменений в тканях периодонта). Эффективная без исследований заболеваний периодонта невозможна количественного качественного состава микрофлоры ротовой полости. Современные лабораторные методы, используемые в мировой практике для идентификации микроорганизмов периодонта, включают: бактериологический метод, микроскопию, иммунологические методы, методы молекулярной диагностики, биохимическое определение маркеров ферментативной деятельности микроорганизмов, маркеров деструкции тканей и воспаления [8].

Выбор и использование различных диагностических тестов определяется возможностью ранней диагностики, до проявления признаков болезни, высокой прогностической ценностью анализа, быстротой выполнения и низкой стоимостью Вместе тем большинство ИЗ перечисленных методов специализированных лабораторных условий, квалифицированного обученного персонала, дорогостоящего оборудования, определенных условий транспортировки собранного биоматериала. Кроме того, продолжительность проведения лабораторного анализа составляет от нескольких часов (например, ПЦР) до нескольких суток (культуральный метод), это приводит к отсроченному оказанию квалифицированной медицинской помощи, увеличению количества посещений, сроков и стоимости лечения

В основе некоторых энзиматических тестов для диагностики периодонтита лежит уникальная способность периопатогенных грамотрицательных анаэробных бактерий комплекса (P. gingivalis, T. denticola И T. forsythia) активность в отношении синтетических трипсинподобную производных нафтиламида. В частности, бактерии красного комплекса способны осуществлять N-α-бензоил-DL-аргинин-2-нафтиламида (БАНА) образованием окрашенного β-нафтиламида [9]. По всей видимости, ферменты, ответственные за трипсинподобную активность P. gingivalis, T. denticola и T. forsythia обладают разными кинетическими свойствами, клеточной физико-химическими И мембраносвязанный (свободный или фермент), сродством определенным синтетическим и натуральным субстратам или ингибиторам. Фермент, выделенный из T. denticola, по-видимому, не является протеазой, но способен гидролизовать эфиры, амиды и пептидные связи, образованные с участием карбоксильной группы аргинина или лизина. Фермент активен в отношении низкомолекулярных синтетических субстратов трипсина (например, N-α-бензоил-L-аргинина этиловый эфир, N-α-бензоил-DL-аргинин-р-нитроанилид, БАНА), но не гидролизует природные субстраты (казеин, гемоглобин, азоказеин, бычьего сывороточного альбумина и желатин) [10]. Для P. gingivalis характерно присутствие мембраносвязанной и свободной форм трипсинподобных ферментов, относящихся к семейству сериновых протеаз. Оба фермента осуществляют протеолиз БАНА, N-α-бензоил-DL-аргинин-р-нитроанилида (БАПНА), казеина и бычьего сывороточного альбумина [11, 12]. Трипсинподобный фермент T. forsythia также является сериновой протеазой, активной в отношении Nсукцинил-*Ala-Ala-Pro-Phe*-р-нитроанилида, желатина, коллагена I типа, но не в отношении БАПНА и коллагена IV типа [13].

Анализ трипсинподобной активности микроорганизмов, формирующих супрагингивальный и субгингивальный налет, показал, что среди 244 лабораторных штаммов, представляющих 51 вид, не обнаружено бактерий способных гидролизовать БАНА. Шесть лабораторных штаммов видов *Bacteroides* и *Capnocytophaga* в некоторых опытах показали незначительную БАНА-положительную активность. Однако диагностически значимая трипсиноподобная активность, в отношении БАНА, была выявлена только у лабораторных и природных штаммов *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* [14].

В ранней работе [9] было обнаружено, что степень гидролиза БАНА субгингивальным налетом, собранным из одного пораженного участка периодонта, строго коррелирует с количеством P. gingivalis, T. denticola и T. forsythia в этом участке. Там же было показано, что 71% проб, полученных от пациентов с диагнозом получавших лечения, не были БАНА-позитивны, антибактериальной терапии снижало число БАНА-позитивных результатов до 8%. Исходя из этого, было предложено использовать БАНА для обнаружения P. gingivalis, T. denticola и T. forsythia в биологических пробах из периодонтальных карманов Впоследствии БАНА-тест был модифицирован для больных периодонтитом. использования непосредственно на рабочем месте стоматолога в течение 5-15 мин, что значительно расширило его диагностический потенциал [15]. Дальнейшие клинические исследования БАНА-теста показали, что тест можно использовать для идентификации P. gingivalis, T. forsythia и T. denticola – видов, строго ассоциированных с развитием периодонтита. Определение P. gingivalis, T. denticola и B. forsythus в 200 пробах субгингвального налета, извлеченного из пораженных участков периодонта 67 пациентов, одновременно БАНА-тестом, ДНК-гибридизацией, методами непрямого иммунофлуоресцентного (нИФА) и иммуноферментного анализа (ИФА) показало, что чувствительность БАНА-теста, относительно других методов, составляет ~90% [16]. В исследовании, проведенном с участием 301 обследуемого, было обнаружено, что чувствительность и специфичность БАНА-теста составляет 91 и 89% соответственно, по сравнению с ИФА, направленным на выявление P. gingivalis, T. denticola и T. forsythsis [17]. В работе [18] было показано, что значение БАНА-теста положительно коррелирует с индексом СРІТN (СРІТN – Community Periodontal Index of Treatment Needs, коммунальный индекс нуждаемости в лечении болезней периодонта). Чувствительность БАНА-теста у пациентов с первичным диагнозом «хронический периодонтит», по сравнению с ДНК-ДНК гибридизацией, составила 95% [19]. Положительный результат БАНА-теста указывает на концентрацию бактерий в пробе равную $\sim 10^{3-4}$ клеток [20], что соответствует установленному этиологически значимому уровню бактериальных периопатогенов в очаге заболевания [15]. Тест не позволяет провести точную количественную оценку бактерий, а также не указывает на то какой из трех видов бактерий, превалирует. Однако, в данном случае, определение конкретного вида не важно, так как независимо от видового соотношения предпочтительный антимикробный агент - метронидазол, одинаково эффективен в отношении всех трех бактерий красного комплекса и безопасен для факультативной микрофлоры ротовой полости.

БАНА-тест можно использовать для оценки эффективности проведенного стоматологического лечения. Количество БАНА-положительных участков периодонта у пациентов с периодонтитом уменьшалось после терапии, включающей скейлинг, корневое сглаживание и лечение антибиотиками. Однако, если после лечения, фиксировали сохранение БАНА-положительной реакции, то следовало ожидать ухудшения клинических показателей для данного секстанта тканей периодонта [21]. В работе [22] было продемонстрировано, что низкие и средние значения диагностических

тестов после проведенного подготовительного этапа лечения, включающего профессиональную гигиену и устранение факторов риска, недостаточны для надежного долгосрочного благоприятного прогноза в отношении состояния обработанных областей зуба и тканей периодонта. Авторы статьи наблюдали, что если после проведенной терапии, сохраняются БАНА-положительные участки в тканях периодонта, то через год можно ожидать потерю эпителиального прикрепления на 0,5 мм; в случае, когда БАНА-тест был отрицательным, потери эпителиального прикрепления не наблюдалось. Клиническое обследование 179 пациентов без признаков болезней периодонта в возрасте от 21 до 64 лет показало, что содержимое периодонтальных карманов в 11% случаев были БАНА-позитивны. В следующей группе, состоящей из 235 лиц 65 лет или старше без стоматологических жалоб, БАНАпозитивными оказалось 30% обследованных. Из 235 пациентов, проходящих лечение в клиниках, стоматологических БАНА-позитивная анаэробная инфекция обнаружена у 90%. При этом в очагах инфекции, определенных с помощью БАНАтеста, необходимость в хирургическом лечении или удалении зуба была выше, чем в БАНА-отрицательных участках периодонта. Положительные результаты БАНА-теста и клинические признаки периодонтита строго ассоциированы с наличием анаэробной бактериальной микрофлоры. Такие клинические признаки как подвижность зуба III степени, вовлечение фуркации II-III степени, рецессия десны, могут служить основанием для хирургического вмешательства. Однако сочетанное использование профессиональной гигиены и антимикробной обработки ротовой полости, проведенное на основании положительных результатов БАНА-теста, уменьшает количество хирургических процедур у пациентов с выраженными клиническими признаками периодонтита. Антибактериальные препараты при их системном (метронидазол, доксициклин) и/или локальном (метранидазол, хлоргексидин) использовании приводят необходимости проведения снижению первоначально рекомендованных хирургических мероприятий на ~90% [23].

Распространенность галитоза (неприятного запаха изо рта) в мировой человеческой популяции составляет 20-50% по данным литературы. В 90% случаев источник неприятного запаха локализован в ротовой полости и является следствием протеолитической активности анаэробных микроорганизмов [24]. БАНА-активные бактерии *in vitro* генерируют различные вещества с неприятным запахом, такие как летучие серосодержащие соединения, валерьяновую, масляную и пропионовую кислоты. Пробы, взятые у пациентов с галитозом с поверхности языка и зубов, были БАНА-положительные в 70 и 90% случаев соответственно. После проведенного лечения хлоргексидином наблюдали уменьшение интенсивности неприятного запаха и снижение количества БАНА-положительных проб на ~50% [25]. Таким образом, БАНА-тест можно рекомендовать для проведения мониторинга эффективности лечения галитоза.

БАНА-тест может быть использован не только для диагностики болезней периодонта. К настоящему времени накоплены данные о связи между заболеваниями ротовой полости и сердечно-сосудистой системы [26]. Было обнаружено, что у пожилых пациентов некоторые показатели здоровья ротовой полости, в том числе и результаты БАНА-теста, коррелируют с признаками сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Вероятность обнаружить положительные результаты БАНА-теста у пациентов с ССЗ была в 2,1 раза больше, по сравнению с пациентами без сердечно-сосудистой патологии [27]. В популяционном исследовании, проведенном с участием 657 обследуемых в возрасте 69±9 лет, была обнаружена положительная взаимосвязь между количеством бактерий на поверхности зубов, в частности *P. gingivalis, T. denticola* и *T. forsythia*, измеренных методом ДНК-ДНК гибридизации, и субклиническими

признаками атеросклероза [28]. Также установлена положительная корреляция между количеством деструктивно измененных участков периодонта, БАНА-позитивных проб и увеличением уровня С-реактивного белка в крови практически здоровых людей среднего и пожилого возраста [29]. Влияние инфекционных заболеваний периодонта на течение кардиоваскулярных заболеваний можно контролировать с помощью соответствующей антибактериальной терапии. У пациентов с болезнями периодонта и эндотелиальной дисфункцией, после проведения профессиональной гигиены, а также фармакологической антибактериальной терапии, наблюдали уменьшение признаков эндотелиальной дисфункции, а также снижение концентрации С-реактивного белка в крови [30]. Таким образом, представляется перспективным использовать БАНА-тест для контроля периодонтопатогенной инфекции, как сопутствующего неблагоприятного фактора у больных ССЗ.

Болезни периодонта ΜΟΓΥΤ являться фактором, увеличивающим преждевременных родов [31]. Исследование, проведенное в Тайване с участием 268 беременных женщин, показало, что частота БАНА-положительных проб в третьем триместре беременности положительно коррелирует с частотой преждевременных родов. Вероятность преждевременных родов была в 5,9 раз выше для женщин, у которых обнаружили ≥2 БАНА-позитивных сайтов по сравнению с женщинами, у которых БАНА-позитивных сайтов было меньше. Авторы работы предлагают использовать значение БАНА-теста как один из предикторов преждевременных родов [32]. В другом исследовании было обнаружено, что положительные результаты БАНАтеста строго ассоциированы с такими нарушениями беременности как выкидыш, преждевременные роды и низкий вес ребенка при рождении [33]. Установленные факты о связи между инфицированностью ротовой полости периопатогенной анаэробной микрофлорой и нарушениями беременности позволяет рекомендовать использование БАНА-теста для скрининга заболеваний периодонта у беременных и проведения соответствующего антимикробного лечения. В пользу этого решения свидетельствуют результаты клинического исследования, в котором было показано, что успешная терапия периодонтита у беременных статистически достоверно приводит к снижению частоты преждевременных родов [34].

Таким образом, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что использование анализа трипсинподобной активности Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola и Tannerella forsythia помогает прогнозировать стабилизацию или развитие генерализованного периодонтита, выявляет заболевание до проявления выраженных воспалительно-деструктивных признаков, а также определяет роль периопатогенов в прогрессировании заболевания. Эти сведения дадут возможность планировать индивидуальное лечение, также стоматологу прогрессирование воспалительно-деструктивных процессов и улучшить качество мероприятий. Учитывая, высокую распространенность профилактических интенсивность болезней периодонта в Республике Беларусь, обоснованно перспективно выполнение комплекса клинико-экспериментальных исследований для разработки отечественных тестов для лабораторной диагностики периодонтита, в том числе позволяющих оценивать трипсинопдобную активность периопатогенов.

Литература

- 1. Teles, R.P. Microbiological goals of periodontal therapy / R.P. Teles, A.D. Haffajee, S.S. Socransky // Periodontol. 2000. 2006. Vol. 42. P. 180-218.
- 2. Ellen, R.P. Spirochetes at the forefront of periodontal infections / R.P. Ellen, V.B. Galimanas // Periodontol. 2000. 2005. Vol. 38. P. 13-32.

- 3. Терапевтическая стоматология. Болезни периодонта: учеб. пособие / Л.Н. Дедова [и др.]; под ред. Л.Н. Дедовой. Минск: Экоперспектива, 2016. 268 с.
- 4. König, J. Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services position paper 1 / J. König, B. Holtfreter, T. Kocher // Eur. J. Dent. Educ. 2010. Vol. 14. P. 4-24.
- 5. Леус, П.А. Стоматологическое здоровье населения Республики Беларусь в свете глобальных целей Всемирной Организации Здравоохранения и в сравнении с другими странами Европы / П.А. Леус // Современная стоматология. − 1997. − № 2. − С. 3-12.
- 6. Дедова, Л.Н. Состояние тканей периодонта и кариеса поверхности корня по данным эпидемиологического обследования 35–54-летних жителей Республики Беларусь / Л.Н. Дедова, О.В. Кандрукевич, Е.А. Бондарик// Стоматологический журн. − 2006. − № 4. − С. 322-323.
- 7. Kinane, D.F. Periodontal diseases / D.F. Kinane, P.G. Stathopoulou, P.N. Papapanou // Nat. Rev. Dis. Primers. -2017. Vol. 22. \cancel{N} $\cancel{2}$ $\cancel{2}$
- 8. Suchett-Kaye, G. Clinical usefulness of microbiological diagnostic tools in the management of periodontal disease / G. Suchett-Kaye, J.J. Morrier, O. Barsotti // Res. Microbiol. 2001. Vol. 152. P. 631-639.
- 9. Loesche, W.J. Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease? / W.J. Loesche, S.A. Syed, J. Stoll // J. Periodontol. 1987. Vol. 58, N₂ 4. P. 266-273.
- 10. Ohta, K. Purification and characterization of an enzyme produced by *Treponema denticola* capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates / K. Ohta, K.K. Makinen, W.J. Loesche // Infect. Immunity. − 1986. − Vol. 53, № 1. − P. 213-220.
- 11. Purification and characterization of a protease from *Bacteroides gingivalis* 381 / H. Tsutsui [et al.] // Infect. Immunity. 1987. Vol. 55, № 2. P. 420-427.
- 12. Characterization of a trypsin-like protease from the bacterium bacteroides gingivalis isolated from human dental plaque / F. Yoshimura [et al.] // Arch. Oral. Biol. -1984. Vol. 29, N0 7. P. 559-564.
- 13. Identification and characterization of a chymotrypsin-like serine protease from periodontal pathogen, *Tannerella forsythia* / K. Hockensmith [et al.] // Microb. Pathog. 2016. Vol. 100. P. 37-42.
- 14. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide / W.J. Loesche [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1990. Vol. 28, N2 7. P. 1551-1559.
- 15. Loesche, W.J. The optimization of the BANA test as a screening instrument for gingivitis among subjects seeking dental treatment / W.J. Loesche, C.E. Kazor, G.W. Taylor // J. Clin. Periodontol. 1997 Vol. 24. P. 718-726.
- 16. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus* / W.J. Loesche [et al.] // J. Clin. Microbiol. -1992. Vol. 30, N2 P. 427-433.
- 17. The use of a rapid enzymatic assay in the field for the detection of infections associated with adult periodontitis / W.A. Bretz [et al.] // J. Public Health Dentistry. -1993. Vol. 53, N = 4. P. 235-240.
- 18. Correlation between the CPITN score and anaerobic periodontal infections assessed by BANA assay / M.F. Grisi [et al.] // Braz. Dent. J. 1999. Vol. 10. P. 93-97.
- 19. The ability of the BANA test to detect *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* / J.A. Andrade [et al.] // Braz. Oral. Res. 2010. Vol. 24, № 2. P. 224-230.
- 20. Haffajee, A.D. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease / A.D. Haffajee, S.S. Socransky // Periodontol. 2000. 1994. Vol. 5. P. 78-111.
- 21. Loesche, W.J. The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (*Treponema denticola*) in periodontal disease / W.J. Loesche, J. Giordano, P.P. Hujoel // J. Dent. Res. 1990. Vol. 69. P. 1696-1990.

- 22. A logistic regression model for the decision to perform access surgery / W.J. Loesche [et al.] // J. Clin. Periodontol. 1997. Vol. 24. P. 171-179.
- 23. The non-surgical treatment of periodontal patients / W.J. Loesche [et al.] // Oral. Med. Oral. Surg. Oral. Path. 1996. Vol. 81. P. 533-544.
- 24. Cortelli, J.R. Halitosis: a review of associated factors and therapeutic approach / J.R. Cortelli, M.D.S. Barbosa, M.A. Westphal // Braz. Oral. Res. 2008. Vol. 22. P. 44-54.
- 25. De Boever, E.H. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor / E.H. De Boever, W.J. Loesche // J. Am. Dent. Assoc. 1995. Vol. 126. P. 1384-1393.
- 26. Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease / K.J. Mattila [et al.] // Clin. Infect. Dis. -1995. Vol. 20, N_2 3. P. 588-592.
- 27. Assessing the relationship between dental disease and coronary heart disease in elderly U.S. veterans / W.J. Loesche [et al.] // J. Am. Dent. Assoc. − 1998. − Vol. 129, № 3. − P. 301-311.
- 28. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness / M. Desvarieux [et al.] // Circulation. -2005. Vol. 111. P. 576-582.
- 29. Systemic inflammatory disease markers, periodontal disease and periodontal infections in an elderly population / W.A. Bretz [et al.] // J. Am. Geritric Soc. 2005. Vol. 53, № 9. P. 1532-1537.
- 30. Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis / G. Seinost [et al.] // Am. Heart J. -2005. Vol. 149, No.6. P. 1050-1054.
- 31. Epidemiology and causes of preterm birth / R.L. Goldenberg [et al.] // Lancet. -2008. Vol. 371. P. 75-84.
- 32. Periodontal disease activity measured by the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide test is associated with preterm births / H.C. Chan [et al.] // J. Periodontol. 2010. Vol. 81. P. 982-991.
- 33. Turton, M.S. A simple point of care test can indicate the need for periodontal therapy to reduce the risk for adverse pregnancy outcomes in mothers attending antenatal clinics / M.S. Turton, R. R. Henkel, C.W.J. Africa // Biomarkers. -2017. -Vol. 22, No. 8. -P. 740-746.
- 34. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth / M. Jeffcoat [et al.] // BJOG. -2011. Vol. 118, No 2. P. 250-256.

TRYPSIN-LIKE ACTIVITY OF MICROORGANISMS IN DIAGNOSIS OF GENERALIZED PERIODONTITIS

S.V. Tkachov¹, L.N. Dedova², O.S. Gorodetska², P.A. Semizhon¹

¹Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology;

²Republic of Belarus Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The short review of literature devoted to use of assessment of trypsin-like activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* in laboratory diagnosis of periodontitis is presented in the article. The test uses for to prognosis stabilization or development of generalized periodontitis, identification periodontal diseases before inflammatory and destructive manifestations and also defines a role of periopatogen in progressing of a disease.

Keywords: periodontitis, gram-negative anaerobic bacteria, tripsin-like activity, $N-\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-naphthylamide.

Поступила 21.11.2018

Оригинальные исследования

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЦЕРКАРИОЗНЫМИ АЛЛЕРГОДЕРМАТИТАМИ В НАРОЧАНСКОЙ КУРОРТНОЙ ЗОНЕ

А.В. Галенчик 1 , Т.П. Швайко 1 , С.Е. Яшкова 1 , Л.Н. Акимова 2

¹ГУ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; ²ГНПО «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам», Минск, Беларусь

Резюме. В данной работе проанализирована заболеваемость населения церкариозными аллергодерматитами в Нарочанской курортной зоне за период 2008-2018 гг.

Ключевые слова: озеро Нарочь, церкариоз, аллергодерматит, гастроподы, промежуточные и окончательные хозяева.

Введение. Церкариоз (шистосоматидный аллергодерматит, зуд купальщиков) имеет официальное название — церкариальный дерматит (шифр по МКБ10 — В65.8), которое означает аллергическое заболевание, вызванное проникновением под кожу человека церкарий семейства *Schistosomatidae* Stiles & Hassall, 1898 (*Trematoda: Digenea*). Диагностика данного заболевания осуществляется на основании данных эпиданамнеза и клинических проявлений болезни.

На озере Нарочь уже много лет регистрируется устойчивый очаг шистосомного аллергодерматита, который возник вследствие нарушения экологического равновесия в озерной экосистеме в 80-90 годах прошлого столетия. Основной причиной возникновения очага церкариоза были природоохранные меры, такие как запрет охоты в курортном регионе. В результате для водоплавающих птиц были искусственно созданы благоприятные условия, способствующие их размножению и выживанию. Следствием явилось значительное увеличение на оз. Нарочь численности дефинитивных хозяев шистосоматид – водоплавающих птиц [1-4].

В курортной зоне, особенностью которой является концентрация на побережье большого количества людей, у птиц, вследствие высокой поведенческой пластичности, выработался особый тип поведения, нехарактерный для естественных природных условий. Они не боятся людей и в значительных количествах концентрируются в пляжных зонах, где их подкармливают отдыхающие. Концентрация людей на побережье курортной зоны существенно увеличила вероятность контактов человека с церкариями и превратила сугубо научную проблему циркуляции паразитов между двумя группами диких животных в чрезвычайно актуальную медико-экологическую проблему.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили гастроподы, собранные в 2018 г. на оз. Нарочь на мелководье (до 0,5 м) трижды (май, июль, август). Сборы гастропод проводились ручным способом с 10 контрольных участков, к которым относятся не только расчищенные от высшей водной растительности пляжные территории, но также территории, прилежащие к границам пляжей. Зараженность гастропод определялась посредством их вскрытия и изучения морфологического строения церкарий с использованием световой микроскопии (увеличение х100, х400). Зараженность гастропод — экстенсивность инвазии — определялась как отношение количества зараженных дигенеями гастропод к количеству обследованных гастропод, выраженное в процентах.

Всего в 2018 г. собрано и обследовано на зараженность дигенеями 3284 экз. гастропод из оз. Нарочь.

Сбор информации осуществлялся за период 2008-2018 гг. на 17 объектах — ОЦ «Нарочанка», санатории - «Белая Русь», «Боровое», «Нарочанский берег», «Журавушка», «Нарочь», «Сосны», «Спутник», ТК «Нарочь», НДОЛ «Зубренок», ОЛ «Чайка», СОК «Приозерный», поликлиника Мядель, ВА «Занарочь», амбулатория № 1, курортный поселок поликлиника № 2, турстоянка «Антонисберг».

С 2010 г. лабораторией паразитологии ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» ежегодно проводится мониторинг на оз. Нарочь, чтобы отслеживать динамику существующего природного очага церкариоза.

Результаты и обсуждение. Установлено, что средняя зараженность гастропод всеми видами дигеней составила 26,8% в 2018 г. При этом самая низкая зараженность гастропод отмечалась в мае (11,0%), а в летние месяцы значительно увеличивалась (31,8% в июле и 34,4% в августе).

Больше всего случаев зарегистрировано в санатории «Нарочанский берег» -35% от всех зарегистрированных, затем в санатории «Нарочь» -13%, в санатории «Журавушка» -12%, в ТК «Нарочь» -11,5%, на остальные объекты приходилось от 0,1 до 7,2%.

За этот же период наибольшее число случаев церкариозных дерматитов регистрировалось в июле -79%, в августе -16% случаев, в июне -5% случаев, в мае случаи не регистрировались.

В период наблюдений 2008-2018 гг. по Нарочанской курортной зоне зарегистрировано 815 случаев церкариозных дерматитов среди людей, в том числе детское население составило 50,6% от заболевших.

Возрастной состав заболевших (от общего количества): 0-2 года -0.6%; 3-6 лет -5.0%; 7-18 лет -45%; 19-60 лет -41%; старше 60 лет -8.4%.

Начиная с 2012 г. заболеваемость начала снижаться. Если в 2012 г. регистрировалось 88 случаев заболеваний, то в 2018 г. зарегистрировано всего 3 случая церкариозного дерматита (таблица).

Таблица — Данные заболеваемости людей шистосоматидными аллергодерматитами в Мядельском районе за 2008-2018 гг.

Год	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Число	143	109	372	42	88	19	15	12	9	3	3
заболевших											
людей											

На рисунке представлены данные по среднегодовой зараженности представителей семейств *Lymnaeidae* и *Planorbidae* шистосоматидами на оз. Нарочь за период 2010-2018 гг. [1-5]. Среднегодовая зараженность гастропод шистосоматидами в 2018 г. составила 0,5%.

Из рисунка видно, что среднегодовая зараженность гастропод обоих семейств шистосоматидами в 2018 г. находится в пределах изменения данного показателя (от 0,5% до 0,9%) за период с 2010 г.

В период наблюдений 2008-2018 гг. по Нарочанской курортной зоне зарегистрировано 815 случаев церкариозных дерматитов среди людей (для сравнения: в период 1995-2007 гг. – 5 232 случая).

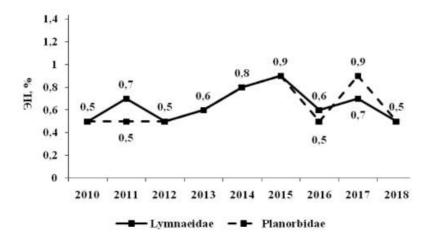


Рисунок – Зараженность гастропод семейств *Lymnaeidae* и *Planorbidae* дигинеями семейства *Schistosomatidae* на оз. Нарочь за период 2010-2018 гг.

С целью снижения заболеваемости церкариозными дерматитами санитарноэпидемиологической службой Минской области и Мядельского района проводится сбор
и анализ информации о случаях заболевания населения церкариозами, комплексное
обследование водоемов, на которых происходит заражение церкариозами, контроль
численности и паразитофорности моллюсков на водоемах, неблагополучных по
церкариозам, осуществляется надзор за выполнением требований санитарных правил и
норм по обустройству и эксплуатации пляжной зоны водоемов, гигиеническое обучение
населения и отдыхающих по вопросам профилактики заболевания церкариозами.
Организована консультативно-методическая работа со специалистами лечебнопрофилактических организаций и санаторно-оздоровительных учреждений, проводится
учет заболеваемости церкариозными аллергодерматитами в разрезе санаторнооздоровительных учреждений.

В разные годы на оз. Нарочь в качестве промежуточных хозяев для представителей семейства Schistosomatidae с 2010 г. и до настоящего времени зарегистрировано 9 видов гастропод, относящихся к двум семействам: Planorbidae — P. corneus, A. vortex, B. contortus, S. nitida и Lymnaeidae — L. stagnalis, S. palustris, R. ampla, R. auricularia, R. baltica. У указанных гастропод отмечено 8 видов шистосоматид — Bilharziella polonica, Dendritobilharzia cf. Исследования, проведенные белорусскими учеными показали, что стабильность очага шистосоматидного церкариоза на озере Нарочь обусловлена высоким разнообразием дигеней семейства Schistosomatidae и их промежуточных хозяев, а активность очага церкариоза с весны до осени поддерживается за счет различий в показателях зараженности отдельных видов гастропод специфичными им видами шистосоматил.

Выводы. Снижению заболеваемости людей шистосоматидными церкариозами в Нарочанской курортной зоне способствовал проводимый комплекс профилактических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости церкариозами в местах массового посещения водоемов населения. Начиная в 2008 г., отработана система санитарной ЛПО, санаторно-оздоровительными взаимодействия службы c учреждениями, определены факторы, оказывающие влияние на заболеваемость церкариозными дерматитами, ведется учет заболеваемости шистосоматидными аллергодерматитами и широкая информационно разъяснительная работа.

Численные значения среднегодовой зараженности гастропод представителями семейства *Schistosomatidae* в 2018 г. находились на нижнем уровне многолетних показателей и не выходили за их пределы, что указывает на стабильность очага церкариоза на оз. Нарочь.

Следует подчеркнуть, что мировой опыт борьбы с очагами шистосомного церкариоза в водоемах западной Европы и Америки говорит о том, что кардинальные меры борьбы до сих пор не разработаны, очаги характеризуются высокой устойчивостью и ликвидируются с большим трудом.

Литература

- 1. Акимова, Л.Н. Современное состояние фауны дигеней (*Trematoda: Digenea*) брюхоногих моллюсков (*Mollusca: Gastropoda*) в водных экосистемах Беларуси / Л.Н. Акимова. Минск: Беларус. навука, 2016. 243 с.
- 2. Факторы, влияющие на распространение церкариальных дерматитов среди людей в курортной зоне озера Нарочь, Беларусь / Л.Н. Акимова, Е.Ю. Ерман, Е.Н. Тарасенок, Т.В. Жукова // Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси: сб. ст. XI Зоол. Междунар. науч.-практ. конф., приуроч. к 10-летию основания ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», Минск, 1-3 нояб. 2017 г.: в 2 т. / редкол.: О.И. Бородин [и др.]. Минск: Издатель А.Н. Вараксин, 2017. Т. 2. С. 20-27.
- 3. Акимова, Л.Н. Результаты мониторинга очага церкариоза на озере Нарочь в 2018 г. / Л.Н. Акимова, Т.В. Жукова, О.С. Ежова // Актуальные проблемы охраны животного мира в Беларуси и сопредельных регионах: тез. докл. 1-й междунар. науч.практ. конф., Минск, 15-18 окт. 2018 г. Минск, 2018. С. 28.
- 4. Нестеренко, С.В. Многолетняя динамика заболеваемости церкариозными аллергодерматитами в Нарочанской курортной зоне» / С.В. Нестеренко, Н.Ю. Малько, А.В. Галенчик // Паразитарные болезни человека, животных и растений: тр. VI Междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 2008. С. 58.
- 5. Энтомологический мониторинг за акаро-энтомофауной и другими биологическими объектами, имеющими медицинское значение в Республике Беларусь: информ-аналит. бюлл. за 2008-2017 гг./ С.Е. Яшкова [и др.]. Минск: РЦГЭиОЗ.

CHERCARIOSIS ALLERGIC DERMATITIS MORBIDITY IN NAROCH RESORT AREA

A.V. Galenchik¹, T.P. Shvayko¹, S.E. Yashkova¹, L.N. Akimova²

¹Minsk Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health;

²Scientific & Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus

In the paper, the incidence of cercarious allergic dermatitis in the Naroch resort area for the period 2008-2018 is analyzed.

Keywords: lake Naroch, Belarus, cercariosis, allergic dermatitis, gastropods, intermediate and final host

Поступила 15.11.2018

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

В.Ю. Земко¹, В.К. Окулич¹, А.М. Дзядзько²

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск:

²Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь

Резюме. Статья отражает современные микробиологические аспекты инфекций в отделении реанимации и интенсивной терапии. Исследована генотипическая резистентность *Klebsiella pneumoniae*. Методом ПЦР выявлены гены ОХА-48, СТХ-М, NDM, обуславливающие резистентность к карбапенемам, природным и полусинтетическим пенициллинам, цефалоспоринам I, II, III и IV поколений у *Enterobacteriaceae*.

Ключевые слова: ПЦР, антибиотикорезистентность, *Klebsiella pneumoniae*, гены резистентности, отделения реанимации и интенсивной терапии.

Введение. В последнее десятилетие глобальное распространение получили устойчивые к карбапенемам представители семейства *Enterobacteriaceae*, затрудняя антимикробную терапию, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [1]. Важным представителем указанного семейства является *Klebsiella pneumoniae*, которая играет заметную роль в структуре возбудителей нозокомиальныгх инфекций [2]. Так, в стационарах России доля *K. pneumoniae* среди энтеробактериальных возбудителей достигает 25-50% [3].

Традиционно карбапенемы рассматривали как препараты резерва для лечения наиболее тяжёлых инфекций, вызваннымих грамотрицательными возбудителями с устойчивостью к антибиотикам других групп. Однако в последнее время наблюдается быстрое распространение резистентности к данной группе антимикробных препаратов во многих регионах мира, в том числе в России и Беларуси. Устойчивость к карбапенемам может быть обусловлена рядом механизмов, однако доминирующей причиной является продукция карбапенемаз. Эта группа ферментов, инактивирующих влактамные антибиотики, включает и сериновые протеазы (например, КРС и ОХАподобные ферменты), а также металло-в-лактамазы, такие как IMP, NDM и VIM. Гены карбапенемаз локализованы на различных подвижных элементах, что определяет их способность к быстрому внутри- и межвидовому распространению [4].

Фенотипическая диагностика резистентности, основанная на оценке задержки роста бактерий при культивировании в присутствии антибиотиков, не всегда позволяет выявить молекулярные механизмы резистентности. С этой целью все шире используют молекулярные методы исследования, которые дают возможность определить наличие генов — детерминант резистентности и получить дополнительную информацию о механизмах формирования устойчивости, что бывает необходимым для оптимизации стратегии антибиотикотерапии и прогнозирования резистентности [5].

Цель: изучить особенности генотипической резистентности *К. pneumoniae* в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Материалы и методы. Бактериологическим методом идентифицировано 224 изолята, выделенные из мокроты пациентов, находящихся на лечении в ОРИТ. 64 изолята идентифицировано методом ПЦР в режиме реального времени. Средний возраст пациентов составил 57,3±15,8 лет. Все изоляты были выделены у пациентов с заболеваниями нижних дыхательных путей. Для проведения исследования использовали комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-экспресс». Мокроту забирали натощак

стерильным влажным тампоном, который помещали в пробирку с реагентом «ДНК-экспресс» (Литех, Россия). Обнаружение ДНК бактериальных патогенов проводили с помощью набора «Септоскрин» в соответствии с инструкцией производителя. Для определения генов резистентности к карбапенемам VIM, NDM, OXA-48, а также генов резистентности к цефалоспоринам СТХ-М использовали наборы реактивов формата «Флуоропол-РВ» комплектации «OneStep». Детектию продуктов ПЦР проводили в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия). Фенотипическую резистентность определяли диско-диффузионным методом.

Результаты и обсуждение. Выделено 22 изолята (9,8%) *S. aureus*, 73 изолята (32,6%) *Acinetobacter spp.*, 75 изолятов (33,5%) *К. pneumoniae*, 33 изолята (14,7%) *Р. aeruginosa*, 5 изолятов (2,2%) *Р. mirabilis*, 5 изолятов (2,2%) *Enterococcus faecium*, 3 изолята (1,3%) *Е. coli*, 2 изолята (0,9%) *S. epidermidis* и 1 изолят (0,4%) *S. haemolyticus*. При выделении ДНК из биологического материала методом ПЦР в 100% случаев были выделены ассоциации микроорганизмов, в то время как при использовании бактериологического метода в 3 случаях (20%) получены отрицательные результаты. Результаты представлены таблице.

Таблица – ДНК бактериальных патогенов, обнаруженная методом полимеразной цепной реакции

Выделенные изоляты	Количество		
	(%)		
S. aureus + Streptococcus spp.	1 (6,7%)		
K. pneumonia + $E.$ coli + $Streptococcus spp.$	1 (6,7%)		
K. pneumonia + Streptococcus spp.	3 (20%)		
K. pneumonia + P . aeruginosa + S . aureus+ S treptococcus spp.	3 (20%)		
K. pneumonia + $E.$ coli+ $S.$ aureus + $Streptococcus$ spp.	1 (6,7%)		
K. pneumonia + Proteus spp. +P. aeruginosa + S. aureus +	1 (6,7%)		
Streptococcus spp.			
K. pneumonia + E. coli + P. aeruginosa + S. aureus +	1 (6,7%)		
Streptococcus spp.			
K. pneumonia + Streptococcus spp. + S. aureus	1 (6,7%)		
Enterobacter spp. + Streptococcus spp.	1 (6,7%)		
Enterobacter spp. + K. pneumonia + Proteus spp. + Serratia spp.	1 (6,7%)		
+ P. aeruginosa + E. coli + S. aureus + Streptococcus spp.			

Во всех случаях изоляты идентифицированные бактериологическим методом были подтверждены методом ПЦР.

91,4% исследованных клинических изолятов *К. pneumoniae* имели один и более ген резистентности. У 80% изолятов выявлен ген OXA-48 (80%), отвечающий за устойчивость к карбапенемам; 51,43% изолятов имели ген CTX-M и 2,86% – ген NDM. Следует также отметить, что 37,14% изолятов имели сразу 3 гена резистентности CTX-M, OXA-48, NDM. По 2 гена резистентности было выявлено в следующих процентных отношениях: 2,86% – NDM и CTX-M; 37,14% – NDM и OXA-48; 11,44% – CTX-M и OXA-48.

Заключение. Таким образом, в последнее время появились и получили распространение изоляты *К. рпеитопіае*, имеющие гены карбапенемаз, что резко сужает спектр эффективных антибиотиков группы карбапенемов, особенно в ОРИТ и несет в себе угрозу дальнейшего распространения антибиотикорезистентности.

Литература

- 1. Kehl, S.C. Global assessment of antimicrobial susceptibility among gram-negative organisms collected from pediatric patients between 2004 and 2012: results from the tigecycline evaluation and surveillance trial / S.C. Kehl, M.J. Dowzicky // J. Clin. Microb. 2015. Vol. 4. P. 1286-1293.
- 2. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes / D. Van Duin [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2013. Vol. 75, No. 2. P. 115-120.
- 3. Лопухов, Л.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л.В. Лопухов, М.В. Эйдельштейн // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. 2000. Т. 4, № 2. С. 96-106.
- 4. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации / И.В. Лазарева [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. − 2016. − Т. 61, № 11-12. − С. 28-38.
- 5. Сидоренко, С.В. Молекулярные механизмы резистетности грамотрицптельных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к цефплоспориновым антибиотикам / С.В. Сидоренко, А.Г. Березин, Д.В. Иванов // Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т. 49, N 3. С. 6-16.

DETERMINATION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* GENOTYPIC MARKERS USING REAL-TIME PCR

V.Y. Ziamko¹, V.K. Okulich¹, A.M. Dzyadzko²

¹Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk; ²Minsk Scientific & Practical Center of Surgery, Transplantology & Hematology, Minsk, Belarus

The article reflects modern microbiological aspects of infection in intensive care unit. Genotypic resistance factors for *Klebsiella pneumoniae* were established. Resistance genes OXA-48, CTX-M, NDM which influence strategic tactics of antibacterial therapy were studied.

Keywords: PCR, antibiotic resistance, *Klebsiella pneumoniae*, resistance genes, intensive care unit.

Поступила 13.08.2018

МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА *ОМРА* БЕЛОРУССКИХ ИЗОЛЯТОВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Ю.М. Капустина, Л.В. Рубаник, Н.Н. Полещук

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

Резюме. Проанализирована 31 нуклеотидная последовательность гена *отрА* изолятов Chlamydia trachomatis, выделенных на территории Республики Беларусь. Установлено, что 13 из них имеют различные точечные мутации, в 58% которых отмечены замены, приводящие к модификации участков полипептидной цепочки мембранного белка МОМР. Примечательно, что ни одна из обнаруженных синонимичных и несинонимичных транзиций и трансверсий не изменяла структуру В-, CTL- или Th- клеточных эпитопов белка MOMP. Целесообразно дальнейшее изучение мутационных процессов в гене отрА для характеристики их локализации и определения значимости в вирулентности и инвазивности циркулирующих штаммов *C. trachomatis.* Это важно ДЛЯ детализации механизмов персистенции прогнозирования возникновения иммунологической толерантности организма на действие патогена.

Ключевые слова. *Chlamydia trachomatis*, мутации, ompA, секвенирование, MOMP.

Введение. Chlamydia trachomatis — широко распространенный во всем мире возбудитель бактериальной природы, способный вызывать развитие серьезных воспалительных процессов урогенитального тракта у мужчин и женщин. К числу основных осложнений урогенитальной хламидийной инфекции относят уретрит, простатит, эпидидимит, цервицит, сальпингит и др., что впоследствии может привести к бесплодию или патологии беременности. Особое медицинское значение урогенитального хламидиоза обусловлено возможностью поражения не только мочеполовых, но и других органов и систем организма человека [1, 2].

Геном *C. trachomatis* содержит около 1,000-1,200 млн нуклеотидов и кодирует порядка 875 различных белков. Наружная мембрана *C. trachomatis* представлена тремя белками, основным из которых является МОМР (от англ. Мајог Outer Membrane Protein, МОМР), на долю которого приходится порядка 60% общей массы мембранных белков [3]. Функционально МОМР представляет собой белок-порин и адгезин и участвует во многих важнейших жизненных функциях патогена — вирулентность, инвазивность, ингибирование лизосомальной активности и др. МОМР является доминантным антигеном *C. trachomatis* и на основании иммунотипирования с использованием поли-или моноклональных антител к этому белку выделяют 14 серотипов и 7 подтипов. Из них, в патологию урогенитального тракта вовлечены серотипы от D до K (включая подтипы Da, Ga, Ia, Ja) [4]. Однако, с развитием методов молекулярной биологии сероидентификация как способ типирования изолятов *C. trachomatis* постепенно вытеснялся. На смену ему пришел сопоставимый метод генотипирования, основанный на определении нуклеотидной последовательности гена *отрА*.

Белок МОМР кодируется хромосомным геном *ompA*. На основании полиморфизма гена *ompA* различают более 60 геновариантов *C. trachomatis* [5]. Ген *ompA* состоит из перемежающихся доменов: 5 константных (CD 1-5) и 4 вариабельных (VDI-IV), кодирующих соответствующие участки белка МОМР. Каждый из вариабельных доменов представляет собой комплекс антигенных детерминант, участвующих как в клеточном, так и в гуморальном иммунном ответе [6]. При этом,

локализация B-, CTL- и Th- клеточных эпитопов относительно домена или гена *отрА* для каждого генотипа имеет свои особенности распределения [7].

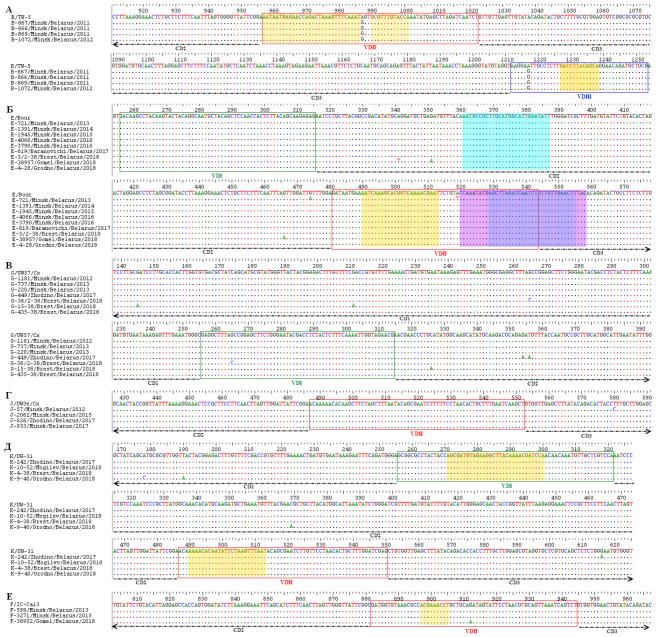
Ген *отрА* является одним из наиболее пластичных в геноме *С. trachomatis*. Мутационные изменения могут затрагивать до 30% от последовательности всего гена, тем самым играя важную роль в адаптивной эволюции патогена [8]. Полагают, что мутации могут являться следствием давления со стороны иммунной системы человека [7, 9]. Также отмечается, что частота нуклеотидных замен выше (56% случаев) в вариабельных доменах, чем в константных (44% случаев) [7].

Наследование мутаций как в вариабельных, так и в константных доменах оказывает патологическое влияние на иммуногенные свойства *С. trachomatis* через изменение аминокислотной структуры эпитопов МОМР белка, тем самым способствуя реактивации или персистенции возбудителя в организме человека.

Цель работы — определить локализацию и проанализировать характер мутаций в гене ompA изолятов C. trachomatis выделенных на территории Республики Беларусь. В задачи исследования входило поиск нуклеотидных замен в полученных участках последовательностей гена ompA C. trachomatis, их характеристика и оценка влияния на изменение аминокислотной структуры B-, CTL- и Th- клеточных эпитопов.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовалась 31 проба, полученная от лиц с лабораторно подтвержденным диагнозом хламидиоз и содержащая ДНК *С. trachomatis*. Изоляты выделены в период 2011-2018 гг. в Республике Беларусь (пробы из Минской, Брестской, Могилевской, Гомельской и Гродненских областей). Амплификацию проводили с помощью специфической пары олигонуклеотидных праймеров, гомологичных гену отрА хромосомной ДНК (Р1-ОМР2) [10]. Затем очищенные ПЦР-ампликоны секвенировали. Определение сходства полученных последовательностей выполняли с помощью средства поиска основного выравнивания локального Nucleotide (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Prot). Для проведения сравнительного анализа, нуклеотидные последовательности референс-штаммов С. trachomatis (B/TW-5 (DQ064293.1), E/Bour (DQ064286.1), F/IC-CAL3 (DQ064287.1), G-UW57 (DQ064299.1), J/UW36 (AF202457.1), K/UW31/Cx (AF063204.2)) получали из международной базы данных Nucteotide NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/). Дальнейшую характеристику исследуемых фрагментов осуществляли с применением программных продуктов «BioEdit», «Chromas», «МЕGA5». Локализация мутаций определялась согласно расположению вариабельных и константных доменов, а также B-, CTL- или Th- клеточных эпитопов в последовательности гена *ompA*, приведенных в работах Yuan Y. et al. и Nunes A. et al. [7, 11]

Результаты исследования и обсуждение. Молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей гена ompA C. trachomatis показал следующее распределение: генотипу генотипическое К В относились последовательности, к генотипу E - 9 (29,0%), к генотипу G - 7 (22,6%), к генотипу J -4(12,9%), к генотипу K-4(12,9%) и к генотипу F-3(9,7%). При этом, у 18 изолятов C. trachomatis, относящихся к генотипам E, G, J, K, F не отмечалось никаких мутационных событий в гене отрА, что свидетельствует о высокой степени его консервативности у этих изолятов. У 13 других выделенных изолятов в последовательностях гена *отрА* обнаруживались только различные точечные мутации (рисунок). Из них, в 42% случаев нуклеотидные замены не вызывали смены аминокислотного состава белка, а оставшиеся 58% мутационных событий приводили к модификации участков полипептидной цепочки МОМР.



Примечание: A — обозначены B-клеточные эпитопы в VDII и VDIII в последовательностях гена ompA генотипа B:

- Б обозначены СТL- клеточный эпитоп в CD2, В-клеточный эпитоп в VDII и перекрывающиеся СТL- и Th-клеточные эпитопы на границе VDII и CD3 в последовательностях гена *отрА* генотипа E;
- B в приведенном участке последовательностей гена ompA генотипа G не располагается ни один из B-, CTL- или Th- клеточных эпитопов;
- Γ в приведенном участке последовательностей гена *отрА* генотипа J не располагается ни один из B-, CTL- или Th- клеточных эпитопов;
- $\mathbb Z$ обозначены В-клеточные эпитопы в VDI и VDII в последовательностях гена ompA генотипа К;
- E обозначен B-клеточный эпитоп в VDII в последовательностях гена ompA генотипа E.

Рисунок – Локализация точечных мутаций в участках гена *отрА* белорусских изолятов *C. trachomatis*

Так, в последовательности гена *ompA* 6 изолятов имелись несинонимичные мутации в вариабельных доменах VDI и VDII. В частности, у всех 4х изолятов, относящихся к генотипу В, отмечалась транзиция в VDII (рисунок, A), приводящая к

замене аминокислоты серина на глицин. У изолята G-449/Zhodino/Belarus/2017 (рисунок, В) зарегистрирована смена метионина на лизин вследствие трансверсии в VDI. Замена гуанина на аденин в кодоне, кодирующем аспарагиновую кислоту, привела к встраиванию вместо нее в белковую последовательность аспарагина у изолята F-38952/Gomel/Belarus/2018 (рисунок, Е). Важно отметить, что все мутации, обнаруживаемые В вариабельных доменах, не изменяли аминокислотной последовательности В-клеточных эпитопов в белке МОМР изолятов С. trachomatis. хотя и располагались в значительной близости от них. Также у всех 4х изолятов генотипа В помимо несинонимичной мутации в VDII присутствовала и синонимичная мутация в VDIII гена *ompA*, а у изолята E-721/Minsk/Belarus/2013 сайленс-мутация обнаруживалась в VDII.

Наряду с мутациями в месте локализации видо- и типоспецифических антигенных детерминант, у 7 изолятов отмечались точечные мутации в константных доменах. В частности, у изолята E-721/Minsk/Belarus/2013, в последовательности гена *отра* которого ранее была обнаружена сайленс-мутация в VDII, присутствала мисенсмутация в CD2. У изолята E-38957/Gomel/Belarus/2018 в CD2 наблюдались как синонимичные, так и несинонимичные транзиции и трансверсии нуклеотидов, не затрагивающие участки эпитопов, расположенные в анализируемой области (рисунок, Б).

Последовательность изолята G-449/Zhodino/Belarus/2017 имела в своем составе 2 мутации (транзиция и трансверсия) в CDII, но эти мутации не влияют на структуру видо- и типоспецифических локусов белка так как, в анализируемом участке нуклеотидной последовательности по литературным данным не располагается ни один из B-, СТL- или Th- клеточных эпитопов [7]. Сходная ситуация наблюдалась и у изолята G-15-38/Brest/Belarus/2018. Для генотипа К в литературе не описано расположение эпитопов в константных доменах CD1, CD2 и CD3, поэтому следует полагать, что присутствующие у двух изолятов генотипа К мутации в этих доменах не антигенных характеристик изолятов. ИЗ изменят одного четырех проанализированных изолятов генотипа Ј (рисунок, Г) несинонимичная транзиция также не затронула область специфических антигенныех детерминант МОМР.

В целом, ген ompA генотипов D, E, F является наиболее стабильным по сравнению с таковым генотипа G, в котором чаще всего наблюдается присутствие нуклеотидных замен [10].

Известно, что появление единичных транзиций и трансверсий в последовательности ompA гена, в большинстве случаев не приводит к серьезным изменениям филогенетических отношений изолятов $C.\ trachomatis$, однако это инициирует появление точечных мутаций на конкретных белковых доменах, которые могут изменять инфекционность, способность к персистенции и передаче возбудителя [7].

Считается, что белковые домены VDI, VDII и VDIV наиболее иммунореактивны, так как в их области располагаются В-клеточные эпитопы белка МОМР *С. trachomatis*. Последние индуцируют запуск гуморального иммунитета и синтеза антител в организме человека, поэтому отмечается, что наибольшее число возможных точечных мутаций присутствует именно в этих регионах [7, 12]. Мутации в В-клеточных эпитопах способны изменять структуру антигенной детерминанты и, соответственно, препятствовать распознаванию и нейтрализации *С. trachomatis* антителами хозяина [9].

Мутации в CD могут приводить к изменениям в структуре CTL и Th-эпитопов, которые отвечают за взаимодействие возбудителя с главным комплексом гистосовместимости. Такая трансформация значимых эпитопов влияет на степень вирулентности *C. trachomatis* и выраженность иммунного ответа. Синонимичные

мутации в VD и CD, хотя и не изменяют состав кодируемого белка, но тем не менее способны изменять структуру мРНК, снижать эффективность трансляции, или модифицировать его третичную структуру.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что последовательности гена *отрА* белорусских изолятов *C. trachomatis*, относящиеся к генотипам B, J и F, характеризуются высокой степенью консервативности, а генотипы E, G и K – меньшей. Эти данные согласуются с работами других исследователей [10]. Частота нуклеотидных замен в VD-регионах составила 26,3% случаев. Уровень мутаций в CD-регионах был выше (73,7%), однако половина нуклеотидных замен являлись синонимичными, и, следовательно, не нарушали основной функции CD – поддержание стабильности структуры белка МОМР. Также следует отметить тот факт, что ни одна из обнаруженных как синонимичных, так и несинонимичных транзиций или трансверсий не изменяла структуру B-, CTL- или Th- клеточных эпитопов белка МОМР. Это дает основание считать, что антигенные характеристики исследуемых белорусских изолятов *C. trachomatis*, в сравнении с таковыми у референс-штаммов, не отличаются.

Из общего количества обнаруженных Выводы. несинонимичных синонимичных транзиций или трасверсий в гене отрА белорусских изолятов *C. trachomatis*, 26,3% встречаются в VD-регионах, остальные 73,7% - в CD-регионах. При этом, обнаруженные мутации не изменяли аминокислотную структуру B-, CTLили Th- клеточных эпитопов белка MOMP. Определение расположения и характера мутаций нуклеотидного состава гена *ompA* C. trachomatis важно для изучения эволюции белка МОМР. Закрепление мутаций в гене и их накопление в процессе эволюции C. trachomatis может привести к изменению конформации MOMP белка и, как следствие, к снижению иммунореактивности антигенных детерминант. Это обусловливает низкий уровень антителообразования, и, в свою очередь, способствует ускользанию возбудителя от иммунного надзора организма человека. Кроме того, изучение мутационных событий может существенно помочь при разработке вакцин и новых видов диагностикумов для борьбы с урогенитальной хламидийной инфекцией.

Литература

- 1. Зур, Н.В. Современные методы лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции / Н.В. Зур, А.Ю. Миронов // Человек и его здоровье (Курский науч.-практ. вестник). -2010. -№ 2. -ℂ. 33-42.
- 2. Рубаник, Л.В. Выявление в Республике Беларусь мутантных «шведского» (nvCT) и безплазмидного вариантов *Chlamydia trachomatis* выделенных от лиц с урогенитальным хламидиозом / Л.В. Рубаник, Ю.М. Капустина, А.Н. Асташонок, Н.Н. Полещук // Мед. новости. -2017. N = 12. C. 49-53.
- 3. Плахова, К.И. Генетические варианты *С. trachomatis* и поиск факторов вирулентности / К.И. Плахова, О.С. Кожушная, Н.В. Фриго // Вестник дерматологии и венерологии. -2012. -№ 3. C. 48-54.
- 4. Rawre, J. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis*: an overview / J. Rawre, D. Juyal, B. Dhawan // Indian J. Med. Microbiol. 2017. Vol. 35, No. 1. P. 17-26.
- 5. *Chlamydia trachomatis* strain types have diversified regionally and globally with evidence for recombination across geographic divides / V. Smelov [et al.] // Front. Microbiol. 2017. Vol. 8. P. 1-14.
- 6. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F / Y. Wang [et al.] // Protein Science. 2006. Vol. 15, No. 1. P. 122-134.

- 7. Adaptive evolution of the *Chlamydia trachomatis* dominant antigen reveals distinct evolutionary scenarios for B- and T-cell epitopes: worldwide survey [Electronic resource] / A. Nunes [et al.] // Plos One. Vol. 5, No. 10. e13171. doi: 10.1371/journal.pone.0013171.
- 8. Genomic analyses of the *Chlamydia trachomatis* core genome show an association between chromosomal genome, plasmid type and disease / B. Vesteeg [et al.] // BMC Genomics. -2018. Vol. 19, No. 1. P. 1-13.
- 9. Population genomics of *Chlamydia trachomatis*: insights on drift, selection, recombination, and population structure / S.J. Joseh [et al.] // Molec. Biol. Evol. 2012. Vol. 29, No. 12. P. 3933-3946.
- 10. Characterization of *Chlamydia trachomatis omp1* genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden / M. Jurstrand [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2001. Vol. 39, No. 11. P. 3915-3919.
- 11. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars / Y. Yuan [et al.] // Infect. Immun. 1989. Vol. 57, No. 4. P. 1040-1049.
- 12. Characterization of *ompA* genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of *Chlamydia trachomatis* infections during 1 year of contact tracing in a Swedish county / M. Lusen [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 42, No. 4. P. 1641-1647.

MUTATIONAL VARIABILITY OF THE OMPA GENE OF BELARUSIAN ISOLATES OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Y.M. Kapustina, L.V. Rubanik, N.N. Poleshchuk

Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

The were analyzed 31 nucleotide sequence of the *ompA* gene of *C. trachomatis* isolates isolated on the territory of the Republic of Belarus. It was established that 13 of them have various point mutations, in 58% of which there are substitutions that lead to the modification of sections of the MOMP polypeptide chain. It is noteworthy that none of the detected synonymous and non-synonymous transitions and transversions did not change the structure of the B-, CTL- or Th- cell epitopes of the MOMP protein. It is advisable to further study the mutational processes in the ompA gene to characterize their localization and determine the significance in virulence and invasiveness of circulating strains of *C. trachomatis*. This is important for detailing the mechanisms of persistence and predicting the occurrence of immunological tolerance of the organism to the action of the pathogen.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, mutations, *ompA*, sequencing, MOMP.

Поступила 06.12.2018

АНАЛИЗ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЯСА ПТИЦЫ МЕХАНИЧЕСКОЙ ОБВАЛКИ

Е.И. Козельцева, И.Е. Лобазова

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию», Минск, Беларусь

Резюме. Мясное сырье (мясо птицы механической обвалки) является благоприятной средой для развития и длительного сохранения жизнеспособности многочисленных микроорганизмов, которые могут вызывать заболевания человека при употреблении в пищу недоброкачественной продукции. Проведение микробиологического контроля позволяет гарантировать санитарное благополучие продовольственного сырья и вырабатываемой из него продукции и предотвращает попадание некачественных продуктов к потребителю. Использование современных хромогенных питательных сред облегчает выделение патогенных микроорганизмов в общем консорциуме, вырастающем на чашках Петри из мясного сырья.

Ключевые слова: патогенные микроорганизмы, хромогенные среды, мясо птицы механической обвалки, общая бактериальная обсемененность.

Введение. Согласно официальной статистики, начиная с 2010 г. в нашей стране наблюдается рост производства мяса птицы [1]. Одним из способов увеличения объемов реализации является поставка в торговую сеть продуктов разделки птицы на отдельные части (грудку, бедро, голень). Таким образом, возникает проблема использования каркасов и крыльев, содержащих меньшее количество мышечной ткани, которая решается путем механической сепарации.

Технологический процесс получения мяса механической обвалки является высокорентабельным, так как им обеспечивается безотходная технология и высокий выход мясной массы от исходного сырья при ее хорошем качестве [2].

Сырые мясо и птица являются наиболее скоропортящимися пищевыми продуктами, поскольку являются благоприятной средой не только для сохранения жизнеспособности микроорганизмов, но и в ряде случаев для их размножения и накопления [2]. В мышечной ткани здоровых животных и птиц, изначально нет никаких микроорганизмов, но она контаминируется ими в процессе технологической обработки: разрубке туш, жиловке, обвалке [3].

По многочисленным данным, измельченное мясо содержит большее число микроорганизмов, чем не измельченное. Измельчение мяса или его перемалывание способствуют увеличению численности микроорганизмов, и распространению их по всему объему, поэтому мясо механической обвалки относят к категории продукции с высоким риском микробной контаминации [4, 5].

Целью работы являлось исследование микробной контаминации мяса птицы механической обвалки, поступающей на рынок Республики Беларусь с использованием хромогенных сред.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы мяса птицы механической обвалки отечественного и зарубежного производства. В отобранных образцах определяли соответствие микробиологических показателей требованиям ТР ТС 021/2011.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов определяли согласно ГОСТ 10444.15-94, используя метод посева в агаризованные питательные среды.

Наличие бактерий группы кишечных палочек в исследуемых образцах определяли согласно ГОСТ 31747-2012, используя метод высева определенного количества продукта в жидкую селективную среду с лактозой.

Исследование образцов мяса птицы механической обвалки на наличие бактерий рода *Salmonella* проводили согласно ГОСТ 31659-2012.

Выявление бактерий рода *Listeria monocytogenes* по ГОСТ 32031-2012.

Результаты и обсуждение. Для исследования были выбраны следующие образцы: мясо механической обвалки (фарш куриный) (производства Литвы, Беларуси, Венгрии), мясо птицы цыпленка-бройлера механической обвалки (производства Литвы и Беларуси), мясо грудки, окорочков, голени цыплят-бройлеров механической обвалки, мясо птицы мехобвалки и дообвалки цыпленка-бройлера мясо механической обвалки «ММО» куриное (производства Беларуси), в общем количестве 30 штук.

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов из навески продукта, готовили ряд десятикратных разведений и из каждого разведения высевали в две параллельные чашки Петри по $1 \, \text{см}^3$, соответственно. Посевы инкубировали при температуре $(30\pm1)^{\circ}$ С в течение (72 ± 3) ч в аэробных условиях. Колонии, выросшие на чашках, подсчитывали с помощью автоматического счетчика колоний Scan 300. Результаты, полученные при исследовании мяса птицы механической обвалки, показали, что в 15 образцах количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ, или общая бактериальная обсемененность) превышало допустимые нормы $1\cdot10^6$ КОЕ/г в 1,5-2,0 раза.

Для выявления бактерий группы кишечных палочек, инокулированные из разведений пробирки инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Пробирки, в которых отмечали помутнение и образование газа, считали положительными. Для дополнительного подтверждения результата, делали высев из жидкой селективной среды на плотную среду МакКонки. Агар МакКонки используется для селективного выделения и идентификации энтеробактерий, также он является селективно-дифференциальной средой выделения кишечных грамотрицательных бактерий. Колонии лактозонегативных бактерии, не изменяли цвета среды, они были бесцветными и прозрачными. Расщепляющие лактозу бактерии образовывали ярко-красные колонии с зоной помутнения вокруг, которая вызвана осадком желчных кислот из-за образования кислоты при сбраживании лактозы. На чашках с посевами отмечали рост типичных колоний. Каждую отобранную для подтверждения колонию пересевали на поверхность скошенного питательного агара и проверяли их принадлежность к колиформным бактериям.

Колиформные бактерии были выявлены в 9 образцах мяса механической обвалки. Учитывая, что мясо птицы является одним из основных пищевых источников

Учитывая, что мясо птицы является одним из основных пищевых источников патогенных бактерий, важное значение имеет санитарно-микробиологический контроль данных микроорганизмов.

Метод обнаружения бактерий рода Salmonella предполагает четыре основных этапа: предобогащение в неселективной среде, обогащение в селективной среде, выделение с использованием селективных агаровых сред и подтверждение презумптивных изолятов. Идентификация сальмонелл может быть достаточно сложной, поскольку многие микроорганизмы, метаболически сходные с сальмонеллами, могут формировать аналогичные колонии на селективной среде, что затрудняет их идентификацию.

В мировой бактериологической практике широкое распространение получили дифференциальные среды нового поколения – хромогенные питательные среды. Механизм действия хромогенных сред заключается во взаимодействии высокоспецифичных ферментов бактерий с хромогенным субстратом, введённым в

состав среды и играющим в ней роль индикатора. Для выделения и прямой родовой идентификации сальмонелл, мы использовали хромогенную среду Rambach Agar (Merck KGaA, Германия) (далее Рамбах-агар). Сальмонеллы ферментируют специфический субстрат — пропиленгликоль до кислоты, в результате чего происходит изменение рНсреды, и колонии сальмонеллы окрашиваются в красный цвет. Для дифференциации сальмонелл от колиформных бактерий в состав среды включена хромогенная смесь, которая выявляет наличие фермента В-галактозидазы — характерного фермента колиформных бактерий, которые растут в виде сине-зеленых или сине-фиолетовых колоний, остальные энтеробактерии и грамотрицательные бактерии, такие как *Proteus, Pseudomonas, Shigella* вырастают в виде бесцветных либо слегка желтоватых колоний. На Рамбах-агаре легко отличить H₂S-продуцирующие штаммы *Citrobacter* от сальмонелл: первые — синего, вторые — красного цвета, тогда как на XLD-агаре или висмут-сульфитном агаре дифференцировать H₂S-продуцирующие бактерии с сальмонеллами затруднительно.

Проведенные исследования показали, что на хромогенной среде Рамбах-агар, в смешанных культурах, бактерии рода *Salmonella*, легко отличимы от других энтеробактерий по малиновому цвету и морфологии колоний.

Полученные на агаризованных средах колонии, предположительно относящиеся к сальмонеллам, подвергали последующей биохимической идентификации. Тестирование выделенных культур по биохимическим признакам мы проводили с использованием готовых стандартных тест-систем наборов для идентификации «АРІ 20Е».

В 8 исследуемых образцах были обнаружены бактерий рода Salmonella.

Вторым из наиболее опасных видов пищевых патогенов считается *Listeria monocytogenes*, поскольку, вызываемые этим микроорганизмом заболевания, характеризуются самым высоким уровнем летальности. Из литературных данных известно, что различные виды листерий достаточно часто выявляются из свежего и замороженного мяса, мяса птицы и полуфабрикатах из мяса птицы [2-5].

Выявление листерий в соответствии с ГОСТ 32031-2012 проводили в два этапа. На первом этапе подготовленную навеску исследуемого продукта в количестве 25 г, вносили в жидкую среду для первичного обогащения со сниженной концентрацией селективных компонентов. После культивирования посевов при 30°С в течение 24 ч проводили второй этап обогащения в среде с полной концентрацией селективных компонентов. Накопительную культуру термостатировали при 37°С в течение 48 ч и высевали на плотную селективную среду PALCAM агар. Посевы на селективных средах просматривали через 24 и 48 часов на наличие роста характерных для листерий колоний.

Следует отметить, что характер роста листерий на плотных питательных средах не позволяет провести даже ориентировочную дифференциацию *Listeria monocytogenes*, от *Listeria spp*, поэтому следует проводить дальнейшую идентификацию по видовым признакам.

В последние годы, для выделения листерий, широко используются хромогенные среды, которые позволяют после этапа селективного обогащения дифференцировать патогенные листерии – от непатогенных.

Нами был использован агар Chromocult® Listeria Selective Agar Ottaviani and Agosti (Мегск КGaA, Германия) (далее ALOA-agar) с селективными добавками. Богатая основа среды обеспечивает оптимальные условия для роста листерий. Включение в среду ингибиторов подавляет рост сопутствующих грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей и грибов. Рост L. monocytogenes и L. innocua не подавляется, тогда как рост других листерий (L. ivanovii) задерживается, или полностью ингибируется (L. seeligeri).

Все листерии обладают активностью фермента β -D-глюкозидазы и образуют при взаимодействии с хромогенным субстратом сине-зеленые колонии. Дифференциация L. monocytogenes от других листерий основана на выявлении активности фермента фосфатидилинозит-фосфолипазы C (PI-PLC). Фосфолипазная активность выявляется по наличию зоны помутнения вокруг колоний L. monocytogenes. Отметим, что кроме L. monocytogenes только L. ivanovii проявляет фосфолипазную активность.

Тестирование выделенных культур листерий по биохимическим признакам проводили с использованием наборов для идентификации «API Listeria» фирмы «ВіоМегіеих» (Франция).

Из исследуемых образцов мяса механической обвалки было выделено 5 культур, которые по результатам родовой и видовой идентификации были отнесены к $L.\ monocytogenes.$

Результаты испытаний представлены в таблице.

Таблица – Результаты исследования мяса птицы механической обвалки

Наименование образца	КМАФАнМ,	БГКП не	Salmonella	L. monocytogenes	
	не более	допускается в	не	не допускается в	
	$1,0 \times 10^{6}$	0,0001 г	допускается в	25,0 г	
	КОЕ/г		25,0 г		
	Результаты исследований				
Фарш куриный	1,6×10 ⁶	обнаружено	обнаружено	не обнаружено	
механической обвалки					
Мясо механической	$2,0\times10^5$	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
обвалки (фарш					
куриный)					
Мясо птицы ц/б-	5,0×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
механической обвалки					
Мясо механической	$2,0\times10^{6}$	обнаружено	обнаружено	обнаружено	
обвалки «ММО»					
«куриное»					
Мясо механической	$1,2\times10^6$	не обнаружено	обнаружено	не обнаружено	
обвалки «ММО»					
«куриное»					
Мясо механической	1,8×10 ⁶	не обнаружено	не обнаружено	обнаружено	
обвалки «ММО»					
«куриное»					
Мясо механической	1,6×10 ⁶	обнаружено	обнаружено	не обнаружено	
обвалки «ММО»					
«куриное»					
Мясо механической	4,0×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
обвалки					
Мясо механической	8,0×10 ⁴	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
обвалки					
Мясо механической	1,6×10 ⁶	обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
обвалки					
Мясо механической	6,0×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
обвалки					
Мясо механической	5,0×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
обвалки					
Мясо цыпленка-	$1,3 \times 10^6$	обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
бройлера механической					
обвалки					
Мясо грудки ц/б	4,0×10 ⁴	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
механической обвалки					

			Продолжение таблицы		
Мясо окорочков ц/б механической обвалки	1,5×10 ⁶	не обнаружено	обнаружено	не обнаружено	
Мясо голени ц/б механической обвалки	1,2×10 ⁵	обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо механической обвалки «ММО» «куриное»	1,6×10 ⁶	не обнаружено	обнаружено	обнаружено	
Мясо механической обвалки «ММО» «куриное»	1,7×10 ⁶	обнаружено	не обнаружено	обнаружено	
Мясо механической обвалки	6,5×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо грудки ц/б механической обвалки	1,4×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо окорочков ц/б механической обвалки	1,6×10 ⁶	не обнаружено	обнаружено	не обнаружено	
Мясо голени ц/б механической обвалки	5,5×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Фарш куриный механической обвалки	2,0×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	обнаружено	
Фарш куриный механической обвалки	2,0×10 ⁶	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо механической обвалки	1,5×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо механической обвалки	1,2×10 ⁶	обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо окорочков ц/б механической обвалки	2,0×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо грудки ц/б механической обвалки	1,1×10 ⁶	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Мясо голени ц/б механической обвалки	5,0×10 ⁵	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	
Фарш куриный механической обвалки	1,8×10 ⁶	обнаружено	обнаружено	не обнаружено	

Таким образом, нами была изучена микробная контаминация образцов с выявлением и идентификацией патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Результаты исследований показали, что показали, что из исследованных нами 30 образцов мяса птицы механической обвалки в 50% образцах КМАФАнМ превышало допустимые нормы более, чем в 1,5-2,0раза; в 30% исследуемых образцов были обнаружены бактерии группы кишечных палочек, в 26,6% — бактерий рода Salmonella и в 16,6% — Listeria monocytogenes.

Также отметим, что в 14 из 17 контаминированных образцов мяса птицы механической обвалки было обнаружено несоответствие сразу по нескольким микробиологическим показателям, что скорее всего указывает на нарушение технологического процесса производства, а также хранения или транспортировки данного продукта, а также затрудняет задачу обнаружения и идентификации необходимого микроорганизма из смешанной культуры.

Заключение. По результатам проведенных нами исследований можно сделать вывод о том, что мясо птицы механической обвалки может представлять серьезную опасность для здоровья человека. Важным звеном для предотвращения попадания в реализацию недоброкачественной и опасной для населения мясной продукции является необходимость проведения микробиологического контроля, что позволяет

гарантировать санитарное благополучие продовольственного сырья и вырабатываемой из него продукции.

Литература

- 1. Реализация скота и птицы на убой (в живом весе) [Электронный ресурс] / Национальный статистический комитет Республики Беларусь. Режим доступа: http://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/realny-sector-ekonomiki/selskoe-hozyaistvo/grafiches kii-material-grafiki-diagrammy-_3/realizatsiya-skota-i-ptitsy-na-uboi-vzhivom-vese-v-hozyaistvah-vseh-kategorii/. Дата доступа: 22.11.2018.
- 2. Татарникова, Н.А. Патогенная микрофлора мяса и мясных продуктов / Н.А. Татарникова, О.Г. Маусь // Ветеринария (Оренбург). 2015. № 1. С. 87-89.
- 3. Джей, Дж.М. Современная пищевая микробиология = Modern Food Microbiology [Электронный ресурс]: учебник: пер. 7-го англ. изд. / М.Дж. Лесснер, Д.А. Гольден, Дж.М. Джей. 3-е изд. (эл.). М.: Лаборатория знаний, 2017. 890 с. Режим доступа: https://rucont.ru/efd/443286. Дата доступа: 22.11.2018.
- 4. Абдулаева, А.М. Микробиологическая обсемененность мяса птицы механической обвалки [Электронный ресурс] / А.М. Абдулаева, М.Н. Лощинин, Т.А. Першина // Приоритетные направления развития науки: сб. материалов междунар. науч.-практ. конф., Москва, 7 июня 2017 г.: в 2 ч. Иркутск: «Научное партнерство «Апекс», 2017. Ч. 2. С. 32-35. Режим доступа: http://docplayer.ru/53944625-Prioritetnye-napravleniya-razvitiya-nauki.html. Дата доступа: 22.11.2018.
- 5. Kanarat, S. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in chicken production chain in Thailand / S. Kanarat, J. Sukhapesna, W. Jitnupong // Thai Veterinary Med. 2011. Vol. 41, No. 2. P. 155-161.

ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL SAFITY OF POULTRY MEAT BONING

E.I. Kozeltsava, I.E. Labazava

Scientific & Practical Center for Foods of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Raw meat (mechanically deboned poultry meat) is a favorable environment for the development and long-term viability of numerous microorganisms that can cause human diseases when eating poor quality products. The use of modern chromogenic nutrient media facilitates the release of pathogenic microorganisms in a common consortium growing on Petri dishes from raw meat. Conducting microbiological control allows you to guarantee the sanitary well-being of food raw materials and products produced from it and prevents the ingress of low-quality products to the consumer.

Keywords: pathogenic microorganisms, chromogenic media, poultry meat boning.

Поступила 23.11.2018

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ TRICHOMONAS VAGINALIS У ЛИЦ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Л.В. Рубаник, П.С. Мельник, Н.Н. Полещук

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

Резюме. Проведена сравнительная оценка частоты встречаемости *Trichomonas vaginalis* в Республике Беларусь при использовании молекулярно-биологического метода детекции. По результатам текущего исследования данный показатель составил 9,63% (95% ДИ: 7,94-11,62%), что является средним значением по сравнению с таковыми ряда стран мира. По данным литературы наибольший показатель частоты встречаемости отмечен в Судане: 85,19% (95% ДИ: 80,67-88,80%), наименьший – в Швеции: 0,10% (95% ДИ: <0,01-0,65%). Проанализирована эффективность лабораторной диагностики патогена с учетом ряда параметров: материала, взятого для исследования, использованных молекулярно-биологических тест-систем и способов амплификации нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: ПЦР детекция, *Trichomonas vaginalis*, методы амплификации нуклеиновых кислот.

Введение. *Trichomonas vaginalis* вызывает воспалительные заболевания урогенитального тракта (УГТ) человека. Проблема урогенитального трихомониаза актуальна во всем мире, при этом общий уровень заболеваемости остается значимым. В Республике Беларусь в 2016 г. только по данным кожно-венерологической службы зарегистрировано 79,1 случаев на 100 000 населения [1].

При неэффективности или незавершенности лечения инфекция может переходить в хроническую и в том числе бессимптомную форму, которая сложно диагностируется. Несвоевременное выявление возбудителя может привести к таким осложнениям как: бесплодие, патологии беременности, рак шейки матки, рак предстательной железы и др. [2, 3].

В настоящее время в качестве одного из основных методов для идентификации возбудителя используют молекулярно-биологический. Существуют разнообразные способы амплификации нуклеиновых кислот, но для диагностики *T. vaginalis* наиболее часто применяют как классическую ПЦР, так и ее модификацию – транскрипционно-опосредованную амплификацию (transcription-mediated amplification (TMA)). В зависимости от вида исследуемого материала (моча, мазок-соскоб из УГТ), способа амплификации и используемой мишени аналитическая чувствительность тест-систем варьирует.

Цель данной работы — оценить частоту встречаемости *T. vaginalis* у лиц с воспалительными заболеваниями УГТ в Республике Беларусь по результатам проведенного ПЦР-исследования и сопоставить с аналогичными работами, выполненными в разных странах мира.

Материалы и методы исследования. Проведен поиск информационных источников в международных базах данных Medline и EMBASE за период 2012-2018 гг., содержащих информацию о частоте встречаемости *T. vaginalis* на основании результатов молекулярно-биологических исследований материала, полученного от лиц с воспалительными заболеваниями УГТ.

Проанализирована величина выборки обследуемых лиц, их половой и возрастной состав, количество выявленных положительных случаев, вид исследованного биологического материала и применяемые диагностические тест-системы.

Для анализа в Республике Беларусь использованы результаты лабораторного обследования на T. vaginalis методом ПЦР 997 пациентов обоих полов, обратившихся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в период 2012-2018 гг. Критерием включения в выборку было наличие в анамнезе пациентов воспалительных заболеваний женских тазовых органов, уретрита, простатита, репродуктивных нарушений (бесплодие, выкидыши, замершие беременности). Материалом для исследования являлись мазкисоскобы из УГТ. Детекция возбудителя производилась с помощью ПЦР набора «Амплисенс T. vaginalis-FL» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ), в котором мишенью является последовательность L23861.1 (GenBank). Аналитическая чувствительность тест-системы составляет $5 \cdot 10^2$ геномных эквивалентов/мл [4].

Данные проанализированы с помощью программного пакета для персонального компьютера STATISTICA 10.0 (StataSoft). Подсчитан процент положительных на *T. vaginalis* проб и его 95% доверительный интервал (ДИ).

Результаты исследования и обсуждение. На основании проведенного ПЦР-исследования 96 из 997 образцов оказались положительными на *T. vaginalis*. Частота встречаемости в Республике Беларусь, исходя из полученных данных, составила 9,63% (95% ДИ: 7,94-11,62%).

На основании критерия поиска для оценки частоты встречаемости T. vaginalis в разных странах мира отобрано 15 информационных источников в виде научных статей, данные которых представлены в таблице.

Отмечен широкий диапазон показателей частоты встречаемости T. vaginalis: от 0,10% (95% ДИ: <0,01-0,65%) в Швеции до 85,19% (95% ДИ: 80,67-88,80%) в Судане. По критерию величины значения все страны были разделены на 3 группы: с высоким (10-100%), средним (1-10%) и низким (0-1%) уровнем выявленных случаев инфицирования.

В группу с высоким значением показателя включены такие страны как: Судан, Иран, Гаити, Мексика и США. Частота случаев значительно варьировала: от 85,19% (95% ДИ: 80,67-88,80%) до 17,41% (95% ДИ: 15,57-19,42%). Примечательно, что в Гаити в двух лабораториях были проведены молекулярно-биологические исследования одного вида материала с помощью различных тест-систем, и при этом получены разные результаты: 27,67% (95% ДИ: 22,90-32,99%) и 17,67% (95% ДИ: 13,75-22,40%) соответственно.

В группу со средним уровнем встречаемости *Т. vaginalis* вошли Турция, Ботсвана, Словения, Саудовская Аравия, Индия, Англия и Республика Беларусь. Показатель Республики Беларусь оказался самым высоким среди указанных стран и составил 9,63% (95% ДИ: 7,94-11,62%) случаев.

В группу с низким уровнем встречаемости T. vaginalis вошли Корея (0,23% (95% ДИ: <0,01-1,42%)) и Швеция (0,10% (95% ДИ: <0,01-0,65%)). Обращает внимание то, что в Исландии при исследовании 431 образца не было обнаружено ни одной положительной пробы.

По статистическим данным в странах западной части Тихого океана и африканского региона количество регистрируемых случаев урогенитального трихомониаза значительно выше (45,3 и 37,4 млн. соответственно) по сравнению с европейскими странами (3,8 млн.) [20]. Вероятно, это может быть связано с различной вирулентностью циркулирующих штаммов, а также с культурными и социально-бытовыми условиями.

Показатель частоты встречаемости может зависеть от ряда факторов, одним из которых является аналитическая чувствительность тест-систем в зависимости от исследуемого материала (моча, мазок-соскоб из УГТ) и его качества. В большинстве

исследований материалом являлись мазки-соскобы. Стоит учитывать, что количество клеток возбудителя в образце является важным. Так при использовании ПЦР тестсистемы «Хретt TV» предел обнаружения патогена составляет не менее 2 клеток/мл.

Таблица – Частота встречаемости *T. vaginalis*

Страна	Авторы и год публикации	Исследуемый материал	Используемая тест-система	Пол	Воз- раст, лет	Кол-во обследу- емых лиц	Частота встреча- емости в % (95 % ДИ)	Уровень
Судан	Saleh et al., 2014 [5]	мазок-соскоб из УГТ	«in-house» ПЦР	ж	н/д	297	85,19 (80,67; 88,80)	
Иран	Rostami, Habibi et al., 2016 [6]	мазок-соскоб из УГТ	≪in-house» ПЦР	Ж	18-50	300	32,00 (26,97; 37,48)	
Гаити (1)	Bristow et al., 2017 [7]	мазок-соскоб из УГТ	Xpert TV	Ж	≥18	300	27,67 (22,90; 32,99)	кий
Мексика	López- Monteon et al., 2013 [8]	моча	≪in-house» ПЦР	Ж	14-90	252	23,41 (18,59; 29,03)	Высокий
Гаити (2)	Jobe et al., 2014 [9]	мазок-соскоб из УГТ	Gen-Probe Aptima TV	Ж	16-78	300	17,67 (13,75; 22,40)	
США	Munson et al., 2016 [10]	моча	Gen-Probe Aptima TV	M	н/д	1493	17,41 (15,57; 19,42)	
Республи каБелару сь	Текущее исследован ие	мазок-соскоб из УГТ	Амплисенс <i>T.</i> vaginalis-FL	м/ж	23-50	997	9,63 (7,94; 11,62)	
Турция	Yar et al., 2017 [11]	моча	«in-house» ПЦР	M	18-50	138	6,52 (3,31; 12.09)	
Ботсвана	Wynn et al., 2016 [12]	мазок-соскоб из УГТ	Xpert TV	Ж	≥18	200	5,00 (2,63; 9,07)	
Словения	Šoba et al., 2015 [13]	мазок-соскоб из УГТ	«in-house» ПЦР	н/д	н/д	155	3,87 (1,60; 8,37)	Средний
Саудовск ая Аравия	Ashshi et al., 2015 [14]	мазок-соскоб из УГТ	FTD STD9	Ж	26-38	135	2,96 (0,90; 7,63)	Cpe
Индия	Sonkar et al., 2016 [15]	мазок-соскоб из УГТ	«in-house» ПЦР	Ж	18 -≥ 56	634	2,05 (1,17; 3,51)	
Англия	Nicholls et al., 2018 [16]	моча	Gen-Probe Aptima TV	Ж	н/д	9186	2,02 (1,76; 2,33)	
Корея	Kim et al., 2017 [17]	моча	мультиплекс- ная ПЦР	M	18-28	436	0,23 (<0,01; 1,42)	
Швеция	Pellrud et al., 2015 [18]	моча	Gen-Probe Aptima TV	м/ж	15-77	961	0,10 (<0,01; 0,65)	Низкий
Исланди я	Hilmarsdotti r et al., 2017 [19]	моча	Gen-Probe Aptima TV	ж	18-56	431	0,00 (0; 1,06)	I

Примечания: м – мужской пол, ж – женский пол; н/д – нет данных.

При этом диагностическая чувствительность и специфичность набора находятся в пределах 96,4-98,9% и 98,9-99,6% соответственно [21]. Аналитическая чувствительность набора «Gen-Probe Aptima TV», принципом которого является ТМА, несколько выше -0,1 клетка/мл, а диагностическая чувствительность и специфичность составляет 100% и 97,9-98,8% соответственно [22]. В тоже время, при использовании в качестве материала мочи, аналитическая чувствительность остается на таком же

уровне, а чувствительность и специфичность набора незначительно снижается до 95.8 % и 98.7 % соответственно [22]. Для «in-house» ПЦР и мультиплексных наборов данные показатели определены не были. Примечательно, что в странах, включенных в группу с низкими показателями, анализировали только образцы мочи. Однако, выявляемость T. vaginalis в мазках-соскобах выше, чем в моче (p = 0.185).

Еще одним фактором, влияющим на индикацию патогена, являются различия в используемых молекулярно-биологических методах. Исходя из приведенных данных, наиболее часто для диагностики *T. vaginalis* применяют ПЦР, реже — ТМА. ПЦР основана на множественной амплификации целевого фрагмента ДНК с помощью ДНК-полимеразы и специфических праймеров. В реакции ТМА задействованы 2 фермента: РНК-полимераза, которая нарабатывает необходимый участок на матрице РНК, и обратная транскриптаза, которая синтезирует кДНК на основе амплифицированных участков РНК.

В настоящее время существует множество вариаций ПЦР тест-систем, включая как различные варианты «in-house» постановки, так и разнообразные коммерческие наборы. Среди используемых наборов в проанализированных работах были такие как: «Амплисенс T. vaginalis-FL» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ), «Xpert TV» (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) и «FTD STD9» (Fast-track diagnostics, Junglinster, Luxembourg)), при этом все они имеют свои особенности. Так, например, тест-система «Хрегt TV» состоит из специального картриджа, содержащего все необходимые компоненты для экстракции ДНК из внесенного биологического образца и последующего выполнения реакции амплификции. При этом проведение реакции и осуществляется результатов c помошью специально разработанной автоматизированной модульной системы GeneXpert System (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) [21]. Набор «FTD STD9» является мультиплексным, и с его использованием возможна одновременная детекция 7 разных возбудителей урогенитальных инфекций (Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum/parvum, Gardnerella vaginalis, Trichomonas vaginalis и Herpes Simplex Virus 1 and 2 type). Однако, при таком варианте постановки может происходить конкуренция за компоненты смеси для амплификации и последующее снижение наработки целевых ДНК-фрагментов. Стоит отметить, что данные о мишенях, используемых в вышеуказанных наборах, из доступной информации получить не представлялось возможным.

Обращает на себя внимание, что в исследованиях с наибольшей частотой встречаемости *T. vaginalis* использована именно «in-house» ПЦР [5, 6]. Для постановки такого типа ПЦР применены различные пары праймеров. В трех из шести исследований в качестве мишени служили мультикопийные участки ДНК-повторов в геноме патогена (GenBank: L23861.1). Примечательно, что именно эта мишень наиболее часто применялась в ПЦР-исследованиях, но частота встречаемости *T. vaginalis* была разной [5, 8, 13]. В остальных работах в равной степени использовали праймеры направленные на повторяющийся ДНК-фрагмент X83109.1 (GenBank), участок спейсерной ДНК (ITS) и ген пируват ферродоксин-оксидоредуктазы В (*pfoB*) [6, 11, 15].

В проанализированных работах фигурировал только один ТМА-набор: «Gen-Probe Aptima TV» При этом выявляемость возбудителя в зависимости от вида исследуемого материала варьировала в широких пределах (от 17,67% (95% ДИ: 13,75-22,40%) на Гаити до 0,00% (95% ДИ: 0-1,06%) в Исландии) [9, 10, 16-19].

Причиной относительно невысокой выявляемости патогена с помощью некоторых молекулярно-биологических методов может быть генетическая вариабельность циркулирующих штаммов, в том числе и наличие мутаций в генах,

используемых в тест-системах в качестве мишеней. Данный фактор, вероятно, является причиной снижения выявляемости и указывает на необходимость поиска новых мишеней и разработки более эффективных тест-систем.

Таким образом, показатель частоты встречаемости во всем мире варьирует в широких пределах и зависит от биологических особенностей возбудителя, исследуемого материала и используемой тест-системы.

Заключение. Частота встречаемости *T. vaginalis* в Республике Беларусь является значимой и составляет 9,63% (95% ДИ: 7,94-11,62%).

ПЦР с использованием в качестве мишени мультикопийных фрагментов ДНК-повторов (GenBank: L23861.1) является наиболее применяемым методом детекции *T. vaginalis*.

Идентификация T. vaginalis в мазках-соскобах с помощью молекулярно-биологических методов более эффективна, чем обнаружение возбудителя этими же методами в моче (p = 0,185).

Имеющиеся сведения о вариациях в геноме *T. vaginalis* сохраняют актуальность усовершенствования имеющихся и разработки новых тест-систем.

Литература

- 1. Здравоохранение в Республике Беларусь: офиц. стат. сб. за 2016 г. Минск: ГУ РНМБ, 2017. 277 с.
- 3. Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: physicians health study / J. R. Stark [et al.] // JNCI. 2009. Vol. 101, No. 20. P. 1-6.
- 4. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК *Trichomonas vaginalis* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Trichomonas vaginalis* FL»: утв. приказом Росздравнадзора 31.12.2009. Москва, 2010. 24 с.
- 5. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* by microscopy, latex agglutination, diamond's media, and PCR in symptomatic women, Khartoum, Sudan / A.M. Saleh [et al.] // Diagnostic Pathology. 2014. Vol. 9, No. 49. P. 1-5.
- 6. Rostami, M.N. *Trichomonas vaginalis* infection and reproductive complications in women from central Iran / M.N. Rostami, A. Habibi // Int. J. Infect. Dis. 2016. Vol. 45, suppl. 1. P. 369.
- 7. Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Trichomonas vaginalis screening and treatment of pregnant women in Port-au-Prince, Haiti / C. C. Bristow [et al.] // Int. J. STD AIDS. 2017. Vol. 28, No. 11. P. 1130-1134.
- 8. Codetection of *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* by PCR in urine samples in a low-risk population attended in a clinic first level in Central Veracruz, Mexico / A. López-Monteon [et al.] // BioMed Res. Int. 2013. Vol. 2013. P. 1-7.
- 9. Epidemiology of sexually transmitted infections in Rural Southwestern Haiti: The Grand'Anse Women's Health Study / K.A. Jobe [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. -2014. Vol. 91, No. 5. P. 881-886.
- 10. Expansion of comprehensive screening of male sexually transmitted infection clinic attendees with *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* molecular assessment: a retrospective analysis / E. Munson [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2016. Vol. 55, No. 1. P. 321-325.
- 11. Diagnosis of trichomoniasis in male patients on performing nested polymerase chain reaction / T.M. Yar [et al.] // Turkiye Parazitol. Derg. 2017. Vol. 41. P. 130-134.
- 12. Acceptability and feasibility of sexually transmitted infection testing and treatment among pregnant women in Gaborone, Botswana, 2015 / A. Wynn [et al.] // BioMed Res. Int. 2016. Vol. 2016. P. 1-6.

- 13. Šoba, B. Trichomoniasis: a brief review of diagnostic methods and our experience with real-time PCR for detecting infection / B. Šoba, M. Skvarč, M. Matičič // Acta Dermatovenerol. APA. 2015. Vol. 24. P. 7-10.
- 14. Prevalence of 7 sexually transmitted organisms by multiplex real-time PCR in Fallopian tube specimens collected from Saudi women with and without ectopic pregnancy / A.M. Ashshi [et al.] // BMC Infect. Dis. -2015. Vol. 15, No. 569. P. 1-11.
- 15. Comparative analysis of syndromic and PCR-based diagnostic assay reveals misdiagnosis / overtreatment for trichomoniasis based on subjective judgment in symptomatic patients / S.C. Sonkar [et al.] // Infect. Dis. Poverty. -2016. Vol. 5, No. 42. P. 1-10.
- 16. Cross-sectional study to evaluate *Trichomonas vaginalis* positivity in women tested for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*, attending genitourinary medicine and primary care clinics in Bristol, South West England / J.E. Nicholls [et al.] // Sexual. Transmit. Infect. 2017. Vol. 94, No. 2. P. 93-99.
- 17. The prevalence of causative organisms of community-acquired urethritis in an age group at high risk for sexually transmitted infections in Korean Soldiers / H.J. Kim [et al.] // J. R. Army Med. Corps. -2017. Vol. 163, No. 1. P. 20-22.
- 18. *Trichomonas vaginalis* infections are rare among young patients attending an STI clinic in Sweden / H. Pellrud [et al.] // Acta Derm. Venereol. 2015. Vol. 95. P. 343-344.
- 19. *Trichomonas vaginalis* is rare among women in Iceland / I. Hilmarsdottir [et al.] // Acta Derm. Venereol. 2017. Vol. 97. P. 1258-1260.
- 20. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting / L. Newman [et al.] // PLoS One. 2015. Vol. 10, No. 12. P. 1-18.
- 21. Cepheid Xpert TV [Electronic resource]: Cepheid. Mode of access: http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/sexual-health/xpert-tv. Date of access: 12.11.2018.
- 22. Aptima Trichomonas Vaginalis Assay [Electronic resource]: Hologic Inc. Mode of access: https://www.hologic.com/package-inserts/diagnostic-products/aptima-trichomonas-vaginalis-assay. Date of access: 12.11.2018.

PREVALENCE OF TRICHOMONAS VAGINALIS AMONG INDIVIDUALS WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE UROGENITAL TRACT

L.V. Rubanik, P.S. Melnik, N.N. Poleshchuk

Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

A comparative assessment of the *Trichomonas vaginalis* prevalence in the Republic of Belarus using molecular biological detection method carried out. According to the results of the current study, this figure was 9.63% (95% CI: 7.94-11.62%). In comparison with other countries, this value was average. According to literary data the highest prevalence was noted in the Sudan 85.19% (95% CI: 80.67-88.80%), the lowest – 0.10% (95% CI: <0.01-0.65%) in Sweden. The efficiency of the pathogen laboratory diagnosis taking into consideration number of parameters: the material taken for the study, used molecular-biological test-systems and methods of nucleic acid amplification analyzed.

Keywords: PCR detection, *Trichomonas vaginalis*, nucleic acid amplification methods.

Поступила 05.12.2018

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ И МАЛАЦЕЗИЙ В СОСКОБАХ КОЖИ

Т.В. Руденкова, С.А. Костюк, И.Г. Шиманская, Н.А. Милькото ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

Резюме. Разработан метод, позволяющий проводить выявление ДНК Candida albicans, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Malassezia furfur, Malassezia globosa, Malassezia sympodialis в соскобах с пораженной кожи пациентов с атопическим дерматитом и экземой с использованием ПЦР в режиме реального времени. Применение разработанного метода позволит объективно оценивать структуру микробного пейзажа в очагах поражений у пациентов с атопическим дерматитом и экземой.

Ключевые слова: ПЦР, *Candida*, *Epidermophyton*, *Malassezia*, *Trichophyton*, атопический дерматит, экзема.

Введение. Атопический дерматит — хроническое воспалительное заболевание кожи, возникающее, чаще, в раннем детском возрасте у лиц с наследственной предрасположенностью к другим атопическим, чаще респираторным заболеваниям, имеющее рецидивирующее течение с возрастными особенностями локализации и морфологии очагов воспаления, характеризующееся кожным зудом и обусловленное гиперчуствительностью как к специфическим (аллергенным), так и к неспецифическим раздражителям [1].

Микробный пейзаж кожи у пациентов с атопическим дерматитом существенно отличается от микрофлоры здоровых людей. Пациенты с атопическим дерматитом подвержены развитию инфекционных поражений кожных покровов (контагиозный моллюск, герпесвирусная инфекция, грибковые поражения). Доказана высокая частота выявления на коже пациентов с атопическим дерматитом грибов родов Malassezia и Candida. При этом у пациентов с атопическим дерматитом данные микроорганизмы выступают в роли источника постоянной антигенной стимуляции, что усугубляет течение заболевания [2-4].

Для изучения влияния дерматофитов, дрожжей, маласейзий на течение атопического дерматита, установления возможной ассоциации между клиническими характеристиками заболевания и составом микрофлоры кожных покровов пациентов, необходимо разработать точный и быстрый метод идентификации данных микроорганизмов.

Цель исследования — на основе использования ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) разработать метод выявления ДНК дерматофитов, дрожжей, маласейзий в соскобах кожи.

Материалы и методы. Объектами исследования явились пациенты 3 групп, которые были сформированы в соответствии с нозологическими формами заболеваний: группа 1 — пациенты с дерматитом (n=18); группа 2 — пациенты с экземой (n=15). В 3 группу (контрольная группа) были включены практически здоровые лица (n=10).

В качестве биологического материала использовали соскобы поверхностного эпителия с пораженных участков кожи пациентов. Для получения соскобов использовали ложку Фолькмана. Полученный материал помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды («ВекторБест», РФ). Пробирки замораживали и оставляли для хранения при температуре -18°C.

В ходе оптимизации метода выделения микробной ДНК из соскобов с пораженных участков кожи пациентов с атопическим дерматитом и экземой были

использованы наборы для выделения нуклеиновых кислот «Проба-НК» («ДНК-технология», $P\Phi$), «Экстракция-100» («ВекторБест», $P\Phi$), «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», $P\Phi$) и метод классической фенол-хлороформной экстракции.

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A_{260/280}).

Выбор последовательности праймеров для идентификации дерматофитов, дрожжей, маласейзий был проведен с использованием программного обеспечения Vector NTI (Ivitrogen).

Полученную ДНК использовали для постановки TaqMan ПЦР-PB с применением Quick-Load Taq 2X Master Mix (Праймтех, PБ) и специально подобранных пар праймеров для каждого микроорганизма. В качестве внутреннего контроля использовали house-keeping ген человека (GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Амплификацию проводили на термоциклере «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистической программы SPSS версия 15.

Результаты и обсуждение. После выделения ДНК из образцов биологического материала с использованием различных наборов реагентов было проведено сравнение значений показателя $A_{260/280}$. Метод выделения с использованием фенол-хлороформной экстракции, был взят в качестве референсного. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Значения $A_{260/280}$, полученные при использовании различных наборов реагентов (Ме (Q_{25}/Q_{75}))

Название набора	A _{260/280}	
«Проба-НК»	1,57 (1,51/1,66)	
«Экстракция-100»	1,71 (1,68/1,78)	
«ДНК-сорб-В»	1,34 (1,13/1,61)	
Метод классической фенол- хлороформной экстракции	1,74 (1,71/1,79)	

Для чистого препарата ДНК с отсутствием примесей белка и других ингибиторов значение $A_{260/280}$ составляет 1,8. Достоверно более высокие значения $A_{260/280}$, близкие к значениям референсного метода (метод фенол-хлороформной экстракции), были установлены при использовании набора реагентов «Экстракция-100» (критерий Манна-Уитни, p<0,05).

После анализа полученных данных был сделан вывод, что для проведения дальнейших исследований по молекулярно-генетической идентификации микробного пейзажа пораженных участков кожи пациентов с атопическим дерматитом и экземой, оптимальным является использование набора реагентов «Экстракция-100» («ВекторБест», РФ).

На следующем этапе с использованием программного обеспечения Vector NTI и базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI BLAST были подобраны пары праймеров (прямой (forward) и обратный (reverse)) и зонды (probe) для выявления методом ПЦР-РВ микроорганизмов: Candida albicans (C. albicans), Candida glabrata Candida parapsilosis (C. parapsilosis), (C. glabrata), Epidermophyton floccosum (E. floccosum), Malassezia furfur (M. furfur), Malassezia restricta (M. restricta), Malassezia Malassezia globose obtusa (M. obtusa), (M. globosa), Malassezia sympodialis (M. sympodialis), Malassezia pachydermatis (M. pachydermatis), Trichophyton rubrum (T. rubrum), Thrichophyton interdigitale (T. interdigitale).

Подобранные последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Последовательности праймеров и зондов для идентификации дерматофитов, дрожжей, маласейзий

Название микроорганизма	Последовательность праймера	Длинна фрагмента, п.о.	
C. albicans 1-forward	CTGTTTGAGCGTCGTTTCTCCCT	**	
C. albicans 1-reverse	AAAGCGATCCCGCCTTACCA	112	
C. albicans 1-probe	AACCGCTGGGTTTGGTGTTGAG		
C. albicans 2-forward	CATGCCTGTTTGAGCGTCGTTT		
C. albicans 2-reverse	CGCCTTACCACTACCGTCTTTCAA	102	
C. albicans 2-probe			
C. glabrata-forward	TAGCCGGTCTGCTACGTTTATTCG		
C. glabrata-reverse	C		
C. glabrata-probe	CTGTGATTTGTCTAGTGTAACCTC		
C. parapsilosis-forward	TATGGGGCCTGCCAGAGATTAAAC		
C. parapsilosis-reverse	GCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT	106	
C. parapsilosis-probe	GTCAACCGATTATTTAATAGTCA		
E. floccosum-forward	ATGATCACTCCCAAGTTGCCGTTG		
E. floccosum-reverse	GCCGCTGACTATATTGAAAGCACG	111	
E. floccosum-probe	GTGATCTACGCTTGGGCCAGAT		
M. furfur-forward	GGATCATTAGTGAAAGCAAGGGCC		
M. furfur-reverse	GCACACGGGTTTGTGGATATTGTG	117	
M. furfur-probe	TACGGACGCCCTACTCGCGTA		
<i>T. interdigitale</i> -forward	CCGACTTATGCCACCTTCGAGTT		
<i>T. interdigitale-</i> reverse	CCGACTTATGCCACCTTCGAGTT	123	
<i>T. interdigitale</i> -probe	TGACTAAGTCCGCGTTTGTTCTGTC		
M. restricta-forward	AACCCGTGTGCACTGTCTTGGA		
<i>M. restricta</i> -reverse	GGTCCAACCAAGTTCCACGTTCAT	116	
<i>M. restricta</i> -probe	GAGAAAGGCTTCAGAGAAGT		
M. globosa-forward	TTAGTGAAGATTCAAGGGCCAGCC		
M. globosa-reverse	TCCTACAACTGTGCACACGGGTT	100	
M. globosa-probe	ATACAGACGTACAATAAGTGT		
M. sympodialis-forward	CATTAGTGAAAGTTTCGGGCCTGC		
M. sympodialis-reverse	TTCGTCATCACAGTGCACAGGG	111	
M. sympodialis-probe	GCAAACACGTCTCTGGCGCCCAT		
M. pachydermatis- forward	CCGTGTGCACTTGTGTTGCTTTG	117	
M. pachydermatis-reverse	CCAGTGACGGTCCAACGTTTACAA	117	
M. pachydermatis-probe	TGTATGGGCGAGCGCACGCATTC		
T. rubrum 1-forward	AGCCCACTTTCGACTGGACCCATA		
T. rubrum 1-reverse	GGTCTGTTCAAGCGATTTCGCA	112	
T. rubrum 1-probe	ACAAAATTTGTGCAAGCCCAGTG		
T. rubrum 2-forward	AAGCAGATCACTCCTCAAATGGCC		
T. rubrum 2-reverse	102		
T. rubrum 2-probe	GGGTCGGGCGTAATCATTACTCAA CTTACAATCTTTAGGAACATCTC	, , –	
M. obtusa-forward	TCATTAGTGAAAGCAAGGGCCTGC		
M. obtusa-reverse	116		
M. obtusa-probe	GCACACGGGTTTGTGGATATTGGT TGCCATACGGACGCGCGCTACTC		

Для $C.\ albicans$ и $T.\ rubrum$ были выбраны по две пары праймеров и зондов с целью найти оптимальные последовательности для достижения наилучшего результата при амплификации.

В качестве флуоресцентной метки для зондов при идентификации дерматофитов, дрожжей, маласейзий с применением TaqMan ПЦР-РВ использовали флуорофор FAM, в качестве гасителя — BHQ1. Детекцию проводили по каналу «Green».

Для выбора гена, который будет использоваться в качестве внутреннего контроля, провели количественный анализ и расчет коэффициента вариации для house-keeping генов человека: *NAGK*, *GAPDH*, *HGUS*, β-актин. House-keeping гены человека присутствуют во всех клетках. Использование данных генов в качестве внутреннего контроля позволяет судить как о правильности проведения всех этапов ПЦР, так и о наличии в пробе клеток человека, т.е. о качестве взятия биологического материала.

Для оценки концентрации house-keeping генов человека использовали плазмидный стандарт, а затем рассчитывали коэффициент вариации (CV) исходя из полученных значений концентраций house-keeping генов [5].

Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций, полученные в ходе исследования.

В результате анализа полученных данных в качестве внутреннего контроля был выбран ген человека GAPDH, т.к. именно для него было установлено самое низкое значение коэффициента вариации — 4,2%. Для генов NAGK, HGUS и β -актин рассчитанные значения коэффициентов вариации находились на уровне 7,6, 11,2 и 9,1% соответственно.

Для амплификации гена *GAPDH* использовали: *GAPDH*-forward – GCCATCAATGACCCCTTCAT, *GAPDH*-reverse – GCCGTGGAATTTGCCGT; *GAPDH*-probe – CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCAGTATGATTCCA [6]. В качестве метки для зонда использовали флуорофор JOE, в качестве гасителя – BHQ2. Детекцию данного гена проводили по каналу «Yellow».

В ходе оптимизации состава амилификационной смеси были протестированы различные объемы внесения праймеров (от 1 до 2 мкл), ДНК (от 3 до 10 мкл) и воды.

По результатам исследований был выбран оптимальный состав амплификационной смеси, в который были включены: 15,0 мкл 2X Quick-Load Taq Master Mix; 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда для идентификации исследуемого микроорганизма; 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда для гена GAPDH; 4,5 мкл воды и 8 мкл ДНК.

При оптимизации программы амплификации варьировали длительность горячего старта (от 5 до 15 мин); длительность этапа денатурации (от 10 до 20 с); длительность (от 30 до 60 с) и температуру (от 58°C до 63°C) этапа отжига; количество циклов амплификации (от 35 до 50). По результатам проведенных исследований был выбран оптимальный вариант программы амплификации: 1 цикл: 95°C – 5 мин; 45 циклов: 95°C – 20 с, 60°C – 40 с.

Для анализа возможности использования подобранных праймеров и зондов, оптимизированного состава амплификационной смеси и программы амплификации при идентификации дерматофитов, дрожжей, маласейзий проводили ПЦР-РВ. Пробы ставили в дублях. Результаты полученные в ходе выполнения данного этапа представлены в таблице 3.

Результат выявления микроорганизма считался положительным при условии, что по каналу «Yellow» для гена *GAPDH* значение порогового цикла находилось в пределах

20-36, а по каналу «Green» значение порогового цикла для специфического участка гена идентифицируемого микроорганизма находилось в пределах 20-40.

Таблица 3. – Результаты выявления дерматофитов, дрожжей, маласейзий в биологическом материале обследованных групп пациентов

Название	Частота выявления, % (п)			
микроорганизма	Группа 1 (n=18)	Группа 2 (n=15)	Группа 3 (n=10)	
C. albicans 1	55,56 (10)	66,67 (10)	50,0 (5)	
C. albicans 2	55,56 (10)	66,67 (10)	50,0 (5)	
C. glabrata	38,89 (7)	33,33 (5)	20,0 (2)	
C. parapsilosis	16,67 (3)	20,0 (3)	0	
E. floccosum	0	0	0	
M. furfur	33,33 (6)	40,0 (6)	30,0 (3)	
M. restricta	0	0	0	
M. obtusa	0	0	0	
M. globosa	22,22 (4)	26,66 (4)	20,0 (2)	
M. sympodialis	44,44 (8)	46,67 (7)	10,0 (1)	
M. pachydermatis	0	0	0	
T. rubrum 1	0	0	0	
T. rubrum 2	0	0	0	
T. interdigitale	0	0	0	

Результат выявления микроорганизма считался отрицательным при условии, что по каналу «Yellow» для гена *GAPDH* значение порогового цикла находилось в пределах 20-36, а по каналу «Green» значение порогового цикла для специфического участка гена идентифицируемого микроорганизма находилось в пределах 0-19 или 41-45.

В случае если по каналу «Yellow» для гена GAPDH значение порогового цикла не определялось, образец подвергался повторному анализу начиная с этапа выделения Π HK.

В ходе проведения исследований в биологическом материале пациентов была выявлена (хотя бы в одном из образцов) ДНК следующих микроорганизмов: *C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, M. furfur, M. globosa, M. sympodialis.*

ДНК *M. restricta*, *E. floccosum*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* не была выявлена ни в одном из образцов, что может являться следствием либо отсутствия данных возбудителей в биологическом материале обследованных пациентов, либо неверным выбором праймеров и зонда для идентификации микроорганизма. Вне зависимости от причины, данные микроорганизмы были исключены из дальнейших исследований.

Для оценки уровня амплификации неспецифических фрагментов ДНК дополнительно был проведен электрофоретический анализ полученных ампликонов. На электрофореграмме присутствовали четкие полоски на уровне детекции специфических фрагментов ДНК гена GAPDH и специфических фрагментов генов идентифицируемых микроорганизмов во всех проанализированных образцах.

После проведения электрофореза из геля вырезали фрагменты, содержащие ДНК идентифицируемых микроорганизмов. Затем ДНК извлекали из геля с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия), для проведения секвенирования с целью анализа нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК, для оценки аналитической специфичности разработанной методики.

Сиквенс-анализ проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 («Applied Biosystems», США) и forward-праймера для каждого гена. Отсеквенированные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit («Qiagen», Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 («Applied Biosystems», США).

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями генов идентифицируемых микроорганизмов on-line поисковой системе **BLAST** В (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации принадлежности той или иной последовательности определенному микроорганизму [7]. Для всех проанализированных образцов совпадение нуклеотидных последовательностей с зарегистрированными находилось на уровне 100%, что позволило сделать вывод о высокой аналитической специфичности разработанного метода (100%) [5].

Таким образом, подобранные пары праймеров и зонды можно использовать для идентификации $C.\ albicans,\ C.\ glabrata,\ C.\ parapsilosis,\ M.\ furfur,\ M.\ globosa,\ M.\ sympodialis.$

По результатам анализа кривых амплификации были выбраны по два образца с высокой концентрацией одного из микроорганизмов (значения пороговых циклов амплификации для данного микроорганизма в данных образцах были самыми низкими) для проведения оценки эффективности протекания ПЦР-РВ.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов ДНК, с целью построения стандартной кривой. Концентрацию ДНК в неразведенном образце условно принимали за 100 и делали 2 разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях.

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации ДНК.

Значения корреляции (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации ДНК в образцах составили от 0,989 до 0,999. Полученные значения эффективности ПЦР находились в пределах от 1,56 (для *C. albicans I*) до 1,71 (для *C. parapsilosis*). Все полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Значения эффективности и корреляции при выявлении дерматофитов, дрожжей, маласейзий

Название микроорганизма	№ образца	E	R^2
C. albicans 1	4	1,57	0,989
C. aibicans 1	17	1,56	0,989
C. albicans 2	22	1,63	0,997
C. aibicans 2	34	1,61	0,995
C alabuata	2	1,71	0,999
C. glabrata	14	1,61	0,997
C navanailesia	5	1,71	0,998
C. parapsilosis	7	1,61	0,996
M. Gorfon	6	1,58	0,997
M. furfur	36	1,69	0,994
M. alabass	16	1,61	0,989
M. globosa	37	1,63	0,994
M. gayan a diglig	12	1,68	0,992
M. sympodialis	31	1,58	0,995

Для выявления *C. albicans* оптимальное соотношение эффективности реакции и корреляции было установлено для последовательностей праймеров и зонда *C. albicans* 2. Именно эти последовательности были выбраны для проведения дальнейших исследований при выявлении соответствующих микроорганизмов.

Заключение. Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации ПЦР-РВ, позволил сделать вывод, что подобранные пары праймеров и зонды, состав амплификационной смеси и программу амплификации можно использовать для идентификации *C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, M. furfur, M. globosa, M. sympodialis.* Использование разработанного метода позволит проводить быструю и объективную оценку микробного пейзажа в соскобах кожи пациентов с атопическим дерматитом и экземой.

Литература

- 1. Зайнуллина, О.Н. Микробиоценоз кожи у детей с атопическим дерматитом / О.Н. Зайнулина // Казанский мед. журн. 2017. Т. 98, № 4. С. 597-602.
- 2. Grice, E.A. The skin microbiome / E.A. Grice // Nat. Rev. Microbiol. -2011. Vol. 9, No. 4. P. 244-253.
- 3. Tognetti, L. Bacterial skin and soft tissue infections: review of the epidemiology, microbiology, aetiopathogenesis and treatment: a collaboration between dermatologists and infectivologists / L. Tognetti // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2012. Vol. 26, No. 8. P. 931-941.
- 4. Мокроносова, М.А. Аллергия на дрожжи рода Malassezia у больных атопическим дерматитом / М.А. Мокроносова // Леч. врач. -2009. -№ 4. C. 18-21.
- 5. Организация системы контроля качества исследований методом полимеразной цепной реакции / Н.А. Бадыгина [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2012. № 1. С. 28-38.
- 6. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA / C.M. Leutenegger [et al.] // Veterinary Immunol. Immunopathol. 1999. Vol. 71. P. 291-305.
- 7. Руденкова, Т. В. Анализ нуклеотидных замен в генах, кодирующих белки цитоадгезии Mycoplasma genitalium / Т.В. Руденкова // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. 2012. N_2 5. С. 185-188.

REAL-TIME PCR METHOD OPTIMIZATION FOR IDENTIFICATION OF CANDIDA AND MALASSEZIA IN SKIN SWABS

T.V. Rudenkova, S.A. Kostiuk, I.G. Shimanskaya, N.A. Milkoto Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

The method which allows to identify Candida albicans, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Malassezia furfur, Malassezia globosa, Malassezia sympodialis DNA in skin swabs of patients with atopic dermatitis and eczema by applying real-time PCR is working out. This method implication will offer an opportunity of objective microflora estimation in lesion area of patients with atopic dermatitis and eczema.

Keywords: PCR, Candida, Epidermophyton, Malassezia, Trichophyton, atopic dermatitis, eczema.

Поступила 08.11.2018

ВИРУСОЛОГИЯ

Оригинальные исследования

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ КАК АКТУАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ И КЛЕТОК

Т.В. Амвросьева¹, З.Ф. Богуш¹, Е.П. Кишкурно², Н.В. Поклонская¹, А.С. Аринович¹, С.В. Байко³

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ³УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Резюме. В статье представлены данные о частоте встречаемости, этиологии и динамике развития вирусных инфекций у реципиентов после трансплантации почки и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Установлено, что у взрослых реципиентов почки доминирующими их возбудителями в посттрансплантационном периоде были цитомегаловирус (ЦМВ) (41,9%), вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) (30,4%) и ВК вирус (ВКV) (17,4%). Эти же патогены оказались наиболее частыми этиологическими агентами вирусных осложнений у реципиентов с клиническими проявлениями инфекционной патологии и дисфункцией трансплантата – ЦМВ (24,4%), ВЭБ (18,8%) и ВКУ (17,6%). У детей после трансплантации почки доминирующими возбудителями инфекций были полиомавирусы. ВКV и/или JCV вирурия регистрировалась у 40,0% реципиентов в раннем послеоперационном периоде и у 47,1% – в позднем. При этом в раннем периоде преобладали ВКV (22,9%), в позднем – JCV (36,8%). У реципиентов ГСК полиомавирусная инфекция регистрировалась у 53,1% детей и 39,1% взрослых. Полученные результаты указывают на активное участие ряда вирусных агентов в развитии посттрансплантационных осложнений и диктуют необходимость регулярного мониторинга в послеоперационном периоде для выработки адекватных схем проводимой терапии с целью профилактики тяжелых последствий вплоть до потери трансплантата.

Ключевые слова: трансплантация, почка, гемопоэтические стволовые клетки, вирусная инфекция, диагностика, вирусные осложнения, полимеразная цепная реакция.

Введение. Несмотря на впечатляющие успехи последних десятилетий, достигнутые в области трансплантации органов и клеток, серьезной проблемой остаются посттрансплантационные инфекционные осложнения, среди возбудителей которых значительную долю занимают вирусные агенты. В основе развития этих осложнений чаще лежит не первичная инфекция, а реактивация присутствующих в организме реципиента вирусов, существовавших ранее в латентной форме. В их число входят цитомегаловирус (ЦМВ), вирусы простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1, 2), вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), Варицелла-Зостер вирус (ВЗВ), вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6), парвовирус В19 (ПВ В19), ВК вирус (ВКV), ЈС вирус (ЈСV), вирус герпеса человека 7 типа (ВГЧ 7), аденовирусы (АдВ).

Инфекции, вызванные этими возбудителями, широко описаны в литературе и имеют весьма серьезные последствия для реципиента и трансплантата. Одним из наиболее распространенных посттрансплантационных осложнений является ЦМВ инфекция. Так, согласно результатам зарубежных исследователей, после трансплантации, независимо от способа антивирусной профилактики, ЦМВ болезнь

развивается у 14-20% реципиентов почки детского возраста, из них до 5% погибают [1]. Реактивация латентной ВЭБ инфекции может быть причиной развития посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания, которое регистрируется в среднем у 1-3% реципиентов, а у детей достигает 1,2-7,0% [2]. Клинически реактивация BKV инфекции у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) чаще всего проявляется в виде геморрагического цистита (развивается у 10-25% реципиентов в течение 1-го года операции). после трансплантации почки виле полиомавирусассоциированной нефропатии (наблюдается у 1-10% реципиентов) [3, 4]. Прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, вызываемая встречается достаточно редко, однако оказывается фатальной для 90% заболевших в течение 1 года после появления симптомов [5].

Своевременное установление этиологии вирусных инфекций в посттрансплантационном периоде имеет важную клиническую значимость, так как позволяет своевременно применить ряд имеющихся в настоящее время лекарственных средств, обладающих противовирусным действием в отношении ЦМВ, ВЭБ, ВЗВ, ВКV, ВПГ 1, 2 и АдВ, а также, при необходимости, осуществить коррекцию иммуносупрессивной терапии.

По современным представлениям наиболее эффективным способом выявления субклинических форм вирусных инфекций у реципиентов является адекватно спланированный их мониторинг, направленный на детекцию диагностически значимых маркеров в раннем послеоперационном периоде и установлении вирусной нагрузки возбудителей для своевременного назначения антивирусной терапии.

В настоящей статье представлены результаты проведенных научно-исследовательских работ по изучению распространенности, этиологической структуры и динамики развития вирусных инфекций у реципиентов почки и ГСК в раннем и позднем посттрансплантационном периодах.

Материалы (объекты) и методы исследования. Обследовано 176 взрослых пациентов почки из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница». Они составили 2 опытные группы: 1-я – реципиенты, в отношении которых проводился вирусологический мониторинг до и после пересадки органа (n = 84), 2-я – реципиенты, обследуемые по клиническим показаниям (n = 92) с клинических проявлений наличием выраженных инфекции (гриппоподобное состояние, миалгия, артралгия, анорексия, астения, лейкопения, тромбоцитопения и др.) или признаков дисфункции трансплантата. Исследовано 937 клинического материала, из них 538 образцов крови и 399 образцов мочи. В образцах крови выявляли генетические маркеры ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6, ВПГ 1, 2, ВЗВ, АдВ, ВКУ, ПВ В19, в моче – маркеры ВКV.

Обследовано 105 детей после трансплантации почки, находящихся на лечении в УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска. Они разделены на 3 группы: 1-я — реципиенты в раннем послеоперационном периоде (первые 3 месяца после пересадки, n=35); 2-я — реципиенты в позднем послеоперационном периоде (более 3-х месяцев после трансплантации, n=87); 3-я — реципиенты с дисфункцией трансплантата (n=14). Исследовано 688 образцов клинического материала. В 248 образцах сывороток крови выявляли генетические маркеры ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6, ВГЧ 7, ВПГ 1, 2, ВЗВ, АдВ, ВКV, JCV, в 440 образцах мочи — маркеры ВКV и JCV.

Обследовано 32 пациента детского возраста после трансплантации ГСК на базе РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Исследовано 399 образцов клинического материала (200 образцов сыворотки крови и 199 образцов мочи) на

маркеры наиболее распространенных возбудителей полиомавирусной инфекции (BKV и JCV).

Обследовано 46 взрослых пациентов после трансплантации ГСК на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» (отделение трансплантации костного мозга) и РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Исследован 301 образец клинического материала (151 сыворотки крови и 150 мочи) на маркеры ВКV и JCV.

Отбор образцов клинического материала (сыворотка крови, моча) осуществлялся по следующей схеме: до 3-х месяцев после трансплантации — каждые 2 недели, с 3-х месяцев до 1 года — каждые 1-3 месяца, в последующем — каждые 3-6 месяцев.

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили транспортной средой в соотношении 1:1 (Амплисенс, Россия). Образцы сывороток крови получали путем инкубирования цельной крови в течение 1 часа при температуре 37°C с последующим центрифугированием при скорости 1500 об/мин в течение 10 мин. Выделение ДНК вирусов из клинического материала проводили коммерческими наборами производства Амплисенс (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Детекцию ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6, ВЗВ, ВПГ 1, 2, ПВ В19 осуществляли с использованием ПЦР тест-систем с гибридизационно-флюоресцентным определением продуктов реакции в режиме реального времени производства Амплисенс (Россия), ВЗВ – производства ДНК-Технология (Россия) согласно инструкциям по применению. Для выявления ДНК АдВ и ВКV использовали ПЦР тестсистемы с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Беларусь) согласно инструкциям по применению. Обнаружение ДНК JCV проводили в соответствии с разработанной методикой определения ДНК полиомавирусов. Выявление ДНК ВГЧ 7 осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием прямого (HHV-7f, 20pmol), обратного (HHV-7r, 20 pmol) праймеров, зонда (HHV-7z, 10 pmol) (Праймтех, Беларусь) [6], MgCl₂ (50 mM), полимеразы SmArt (АртБиоТех, Беларусь), смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs), H₂O.

Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGene 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия) и CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, CIIIA).

Результаты и обсуждение. Этиологическая структура и кинетика развития вирусных инфекций у взрослых реципиентов почки. Проведенная для реципиентов 1й группы генодиагностика, направленная на выявление маркеров потенциальных возбудителей вирусных инфекций (ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1, 2, ВКУ, ВГЧ 6, ВЗВ, АдВ, ПВ В19) осуществлялась однократно до трансплантации органа и в динамике в течение 1 года после операции. В результате исследований, выполненных до трансплантации органа, частота обнаружения генетического материала (ДНК) ЦМВ, ВЭБ, АдВ, ВКV и ВПГ 1, 2 в сыворотке крови и моче обследованных реципиентов этой группы составила 5,0%, 6,3%, 5,6%, 1,8% и 3,2% соответственно. При этом ДНК ВЗВ, ПВ В19 и ВГЧ 6 не обнаруживалась (рисунок 1). В посттрансплантационном периоде генетические маркеры детектируемых возбудителей были выявлены у 50 пациентов из 84 обследованных (виремия/вирурия имела место хотя бы однократно за весь период наблюдения), что составило 59,5%. При этом частота обнаружения ДНК ЦМВ составила 41,9%; BЭБ – 30,4%; BKV – 17,4% (все случаи были представлены BKV вирурией без регистрации виремии); $B\Gamma \text{Ч } 6 - 5.6\%$; A g B - 1.9%; $\Pi B B 19 - 1.7\%$. Результаты ПЦР детекции ВПГ 1, 2 и ВЗВ в клиническом материале оказались отрицательными.

Среди вирусных патогенов, обнаруженных у реципиентов 1-й группы, доминировали ЦМВ, ВЭБ и ВКV (рисунок 2). ВГЧ 6, АдВ и ПВ В19 выявлялись в

следующих сочетаниях с ЦМВ и ВЭБ: ЦМВ+ВГЧ 6 (6,0%); ВЭБ+АдВ, ЦМВ+ПВ В19 и ЦМВ+ВЭБ+ВГЧ 6 (по 2,0%).



Рисунок 1. – Частота выявления генетических маркеров возбудителей вирусных инфекций у взрослых реципиентов почки

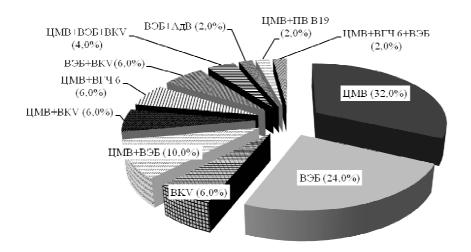


Рисунок 2. – Структура обнаруженных вирусов у взрослых реципиентов почки

Сроки первичного обнаружения генетических маркеров возбудителей в посттрансплантационном периоде различались. При ЦМВ инфекции они регистрировались на $45,4\pm4,05$ сутки, при ВЭБ инфекции — на $31,8\pm5,06$ сутки, при ВКV инфекции — на $38,1\pm8,67$ сутки.

Кинетика развития доминирующих инфекций в течение 1 года после трансплантации органа представлена на рисунке 3. Первые случаи лабораторного обнаружения ЦМВ виремии регистрировались уже на 4-е сутки после операции. Далее наблюдалась выраженная тенденция увеличения частоты обнаружения возбудителя в крови с достижением пика ко 2 месяцу (43,9%). В период 2,5-3 месяца имело место плато - уровни регистрации генетических маркеров возбудителя колебались в незначительных пределах (от 27,8% до 28,6% соответственно). В течение 3-6 месяцев после трансплантации наблюдалось снижение уровней их выявления до 25,0%, а в более поздний период они детектировались эпизодически или не обнаруживалась вовсе.

Динамика выявления ВЭБ виремии отличалась выраженным нарастанием доли положительных проб в период с 14 суток до двух месяцев с пиком регистрации на 1 месяц после трансплантации (22,2%) и постепенным снижением к 3 месяцу (до 7,3%).

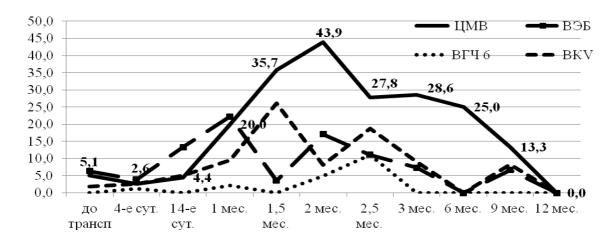


Рисунок 3. – Кинетика развития доминирующих вирусных инфекций у взрослых реципиентов почки, %

Для BKV инфекции было характерно постепенное нарастание регистрации вирурии в течение 1,5 месяцев наблюдения до 26,1% с последующим снижением до 9,1% к 3 месяцу.

Маркеры ВГЧ 6 обнаруживались в крови реципиентов значительно реже с пиком регистрации в период 2,5 месяца после трансплантации (11,1%).

В более поздние сроки наблюдения выявление данных инфекций отмечалось эпизодически.

Вирусологическое обследование реципиентов почки по клиническим показаниям, в том числе с признаками дисфункции аллографта (2-я группа пациентов, n = 92) выявило наличие генетических маркеров возбудителей вирусных инфекций у 44 из них (47,8%). Доминирующими агентами в этиологической структуре обнаруженных вирусных инфекций (рисунок 4) были ЦМВ (24,4%), ВЭБ (18,8%) и ВКV (17,6%). Частота выявления ДНК ВГЧ 6 составила 7,9%, ПВ В19 — 6,7%. При этом случаи обнаружения генетических маркеров ВПГ 1,2, ВЗВ и АдВ в данной группе реципиентов отсутствовали.

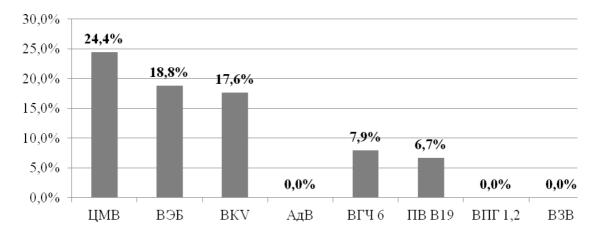


Рисунок 4. – Частота выявления вирусных инфекций, регистрируемых у реципиентов почки с клиническими проявлениями инфекций и дисфункцией трансплантата

Из 44 вируспозитивных реципиентов у большинства (84,1%,) была зарегистрирована моноинфекция, вызванная ЦМВ (38,6%), ВЭБ (27,3%), ВКV (11,4%), ПВ В19 (4,5%) и ВГЧ 6 (2,3%). У 15,9% человек имело место смешанное инфицирование двумя возбудителями: ЦМВ+ВГЧ 6 (6,8%); ЦМВ+ВЭБ (4,5%); ВЭБ+ВКV и ВЭБ+ВГЧ 6 (по 2,3%) (рисунок 5).

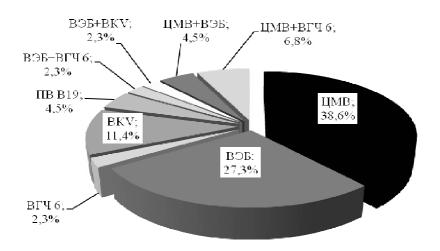


Рисунок 5. – Этиологическая структура вирусных инфекций у позитивных реципиентов почки с клиническими проявлениями инфекций и дисфункцией трансплантата

Этиологическая структура и кинетика развития вирусных инфекций у реципиентов почки детского возраста. Вирусологическое обследование проводилось в разные сроки после трансплантации органа: в 1-ой группе детей (n=35) – в раннем периоде (первые 3 месяца после операции), во 2-й группе детей (n=87) – в позднем периоде. Спектр детектируемых вирусных патогенов включал ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6, ВГЧ 7, ВПГ 1, 2, ВЗВ, АдВ, ВКV, JCV.

По результатам проведенной генодиагностики вирусных инфекций у детей в раннем послеоперационном периоде частота определения ДНК детектируемых возбудителей в крови составила 20,0% (7 позитивных пациентов). Этиологическая структура выявленных вирусных инфекций в 2,9% была связана с ВЭБ; в 14,7% – с ВГЧ 6; в 3,3% – с ВГЧ 7. При исследовании образцов мочи ДНК полиомавирусов (ВКV и/или JCV) обнаруживалась у 40,0% обследованных (14 позитивных детей): ВКV вирурия регистрировалась у 22,9% реципиентов, JCV вирурия – у 20,0% (рисунок 6). В целом по результатам ПЦР диагностики частота выявления вирусных инфекций в раннем послеоперационном периоде составила 57,1% (20 позитивных реципиентов). При этом у 1 пациента было отмечено одновременное выявление ДНК ВКV и JCV. Еще у одного пациента при динамическом наблюдении определена виремия ВЭБ и вирурия ВКV. Случаи обнаружения ВПГ 1, 2, ЦМВ, ВЗВ и АдВ в 1-й группе детей отсутствовали.

Результаты ПЦР исследований крови детей в позднем послеоперационном периоде (рисунок 6) показали, что частота выявления ДНК вирусных патогенов составила 8,0% (7 позитивных пациентов). Этиологическая структура выявленных вирусных инфекций была представлена ВЭБ (1,2%), ВГЧ 6 (3,6%), ВГЧ 7 (2,4%), АдВ (2,3%). ПЦР исследования мочи пациентов показали наличие ДНК полиомавирусов у 41 реципиента (47,1%), при этом ВКV вирурия регистрировалась у 14,9% пациентов, ЈСV вирурия – у 36,9%. В целом по результатам ПЦР диагностики частота выявления вирусных инфекций в позднем послеоперационном периоде составила 51,7% (45

позитивных реципиентов). Смешанное инфицирование 2 возбудителями отмечалось у 4 детей и было представлено следующими сочетаниями: BKV+JCV, BKV+BГЧ 7, ВЭБ+ВКV, BKV+ВГЧ 6. Случаи обнаружения ЦМВ, ВПГ 1, 2 и ВЗВ во 2-й группе детей-реципиентов отсутствовали.

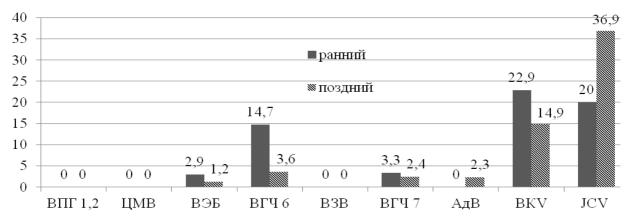


Рисунок 6. — Частота выявления вирусных инфекций, регистрируемых у детей после трансплантации почки в раннем и позднем послеоперационных периодах, %

Таким образом, как в раннем, так и в позднем послеоперационном периодах, среди выявленных вирусных инфекций доминировала полиомавирусная инфекция (ПВИ), вызванная ВКV и/или JCV, что послужило основанием для изучения кинетики ее развития. В результате проведенных исследований установлено, что ВКV инфекция, начиная с 4 суток, в течение первых 3 месяцев после трансплантации (рисунок 7) имела тенденцию к росту с достижением максимальных показателей ко 2-3 месяцу (50,0% и 62,5% соответственно). Кинетика развития JCV инфекции, после достижения максимальных значений к первым двум неделям после операции (71,4%), наоборот, имела тенденцию к снижению вплоть до 14,3% к 3 месяцу после пересадки почки.

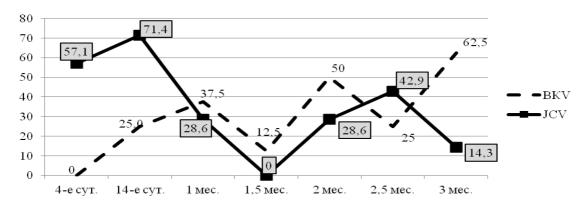


Рисунок 7. – Кинетика развития BKV и JCV инфекции у детей после трансплантации почки в раннем послеоперационном периоде, %

При этом частота первичного выявления BKV инфекции регистрировалась в период с двух недель до 1 месяца и к 3 месяцам после операции (по 25,0% соответственно). Максимальное количество случаев регистрации первичного выявления JCV инфекции отмечалось в первую неделю после трансплантации почки (57,1%) с последующим снижением выявления новых эпизодов до 14,3% (рисунок 8).

В позднем посттрансплантационном периоде кинетика развития BKV инфекции показала ее снижение с 3 месяцев после операции вплоть до 1 года и более (до 10,4%)

(рисунок 9). Пик активации JCV инфекции, наоборот, приходился на период более 1 года после трансплантации (39,0%).

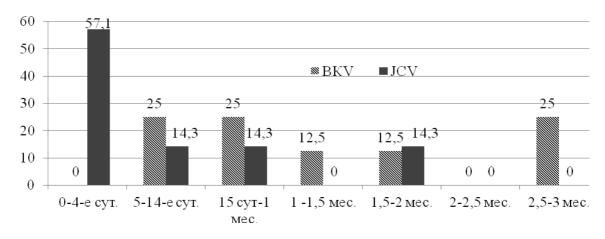


Рисунок 8. – Динамика частоты первичного выявления BKV и JCV инфекции у детей после трансплантации почки в раннем послеоперационном периоде, %

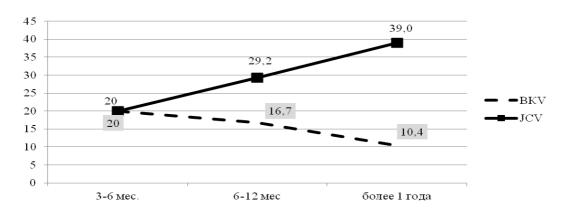


Рисунок 9. – К инетика развития ВКV и JCV инфекции у детей после трансплантации почки в позднем послеоперационном периоде, %

Все случаи регистрируемой ПВИ сопровождались вирурией. Среди реципиентов с выявленными ВКV и/или JCV инфекциями имелись как пациенты с транзиторной ПВИ (регистрацией однократной вирурии), так и пациенты (6 детей; 5,7%), у которых возбудитель в моче обнаруживался в течение 2-х и более месяцев.

Следует отметить, что в нашем исследовании динамическое наблюдение за развитием инфекционных процессов у детей-реципиентов почки осуществлялось на фоне использования универсальной схемы профилактики ЦМВ инфекции ацикловиром/валганцикловиром. За время проведения исследования ни у одного из пациентов, как в раннем, так и в позднем посттрансплантационном периодах не было отмечено ни одного клинического случая ее проявления, что подтверждалось отрицательными результатами ПЦР диагностики.

ВЭБ и ВГЧ 6 инфекции, зарегистрированные у реципиентов в раннем периоде после пересадки почки, а также АдВ, ВГЧ 6 и ВГЧ 7 инфекции, выявленные в позднем послеоперационном периоде, протекали транзиторно (в подавляющем большинстве случаев отмечалась регистрация однократной виремии).

Среди пациентов с дисфункцией трансплантата (n = 14, дисфункция аллографта отмечена у 1 ребенка в раннем и у 13 детей в позднем периоде после операции) по результатам ПЦР исследований вирусные инфекции, представленные ВГЧ 6, ВКV и

JCV, были выявлены у 9 из 14 обследованных реципиентов (64,3%). У 1-го ребенка зарегистрирована ВГЧ 6 инфекция, у 2-x-BKV, у 4-x-JCV. Еще у 2-x детей выявлено смешанное инфицирование двумя возбудителями – ВГЧ 6+BKV и ВГЧ 6+JCV. В целом ВГЧ 6 виремия наблюдалась у 3 детей (21,4%), ВКV и/или JCV вирурии – у 8 (57,1%).

Этиологическая структура и кинетика развития ПВИ у взрослых и детей реципиентов ГСК. Обследованы 2 группы реципиентов ГСК – взрослые (n = 46) и дети (n = 32), в отношении которых выполнена дифференциальная генодиагностика ПВИ, направленная на выявление наиболее широко распространенных ее возбудителей – ВКУ и JCV.

Согласно полученным результатам (рисунок 10), маркеры ПВИ регистрировались у 53,1% обследованных детей (17 позитивных) и у 39,1% взрослых (18 позитивных). У детей все случаи ПВИ были представлены ВКV инфекцией, у взрослых – как ВКV инфекцией (37,0%), так и в небольшом проценте (8,7%) – JCV инфекцией.

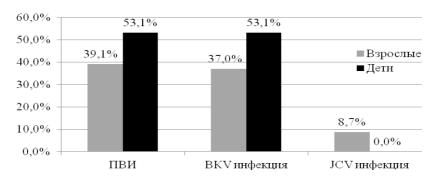


Рисунок 10. – Частота регистрации ПВИ у детей и взрослых реципиентов ГСК

ВКV виремия имела место у 29,4% детей и у 4,4% взрослых от числа позитивных (рисунок 11). Случаев выявления JCV виремии зарегистрировано не было. Интересно отметить, что в нашем исследовании JCV инфекция не регистрировалась у детей, а у взрослых ее маркеры обнаруживались лишь в моче. Они были выявлены у 3 пациентов в сочетании с маркерами BKV инфекции и у одного пациента была зарегистрирована JCV моноинфекция.

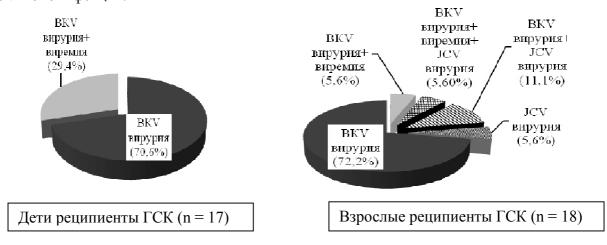


Рисунок 11. – Результаты выявления полиомавирусной вирурии и виремии у детей и взрослых реципиентов ГСК

Пик первичного обнаружения BKV инфекции у детей и взрослых реципиентов ГСК приходился на период 14 суток — 1 месяц после пересадки костного мозга.

Максимально поздние сроки ее выявления ограничивались 1,5-2 месяцами после операции. В среднем первичная регистрация генетических маркеров ПВИ у взрослых реципиентов ГСК отмечалась на $21,4\pm10,3$ сутки после трансплантации, у детей – спустя $18,12\pm12,65$ суток. При этом BKV виремия регистрировалась через 1,5-3,5 месяца после выявления BKV вирурии.

Случаи обнаружения генетических маркеров JCV инфекции у взрослых реципиентов ГСК были немногочисленными, они отмечались как до трансплантации, так и в поздние (спустя 9 месяцев) сроки после операции и носили транзиторный характер (рисунок 12).

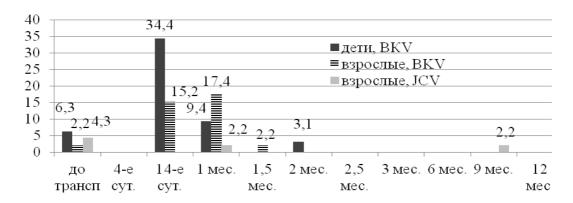


Рисунок 12. – Частота первичной регистрации возбудителей ПВИ у детей и взрослых реципиентов ГСК, %

Кинетика развития ВКV инфекции у детей в течение 1 года после трансплантации ГСК характеризовалась регистрацией 2-х пиков — на 14 сут-1месяц (когда доля пациентов с лабораторно подтвержденной инфекцией составляла 37,5%-31,3%) и спустя 2,5 месяца после операции (18,8%) с последующим ее снижением вплоть до 3,1%. У взрослых реципиентов ГСК пик отмечался спустя месяц после трансплантации (26,1%) с последующей тенденцией к снижению (рисунок 13).

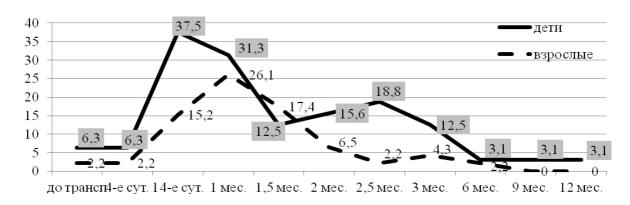


Рисунок 13. – Кинетика развития BKV инфекции у детей и взрослых реципиентов ГСК, %

У всех реципиентов ГСК с лабораторно подтвержденной ВКV инфекцией определялась вирусная нагрузка. Показатели вирусной нагрузки, имеющие предиктивную ценность (в сыворотке крови $>10^4$ копий/мл, в моче $>10^7$ копий/мл), отмечались у 27,5 % детей-реципиентов ГСК и у 23,5% взрослых.

Посттрансплантационная патология мочевыводящей системы, ассоциированная с ПВИ, наблюдалась у 8 детей-реципиентов ГСК (25,0%, 8/32), у 5 из них развился

геморрагический цистит (15,6%). Среди взрослых реципиентов ГСК посттрансплантационные полиомавирусассоциированные осложнения отмечались у 8,7% (4/46). При этом у 3 реципиентов с лабораторно подтвержденной ПВИ развился геморрагический цистит (6,5%), у 1 – гематурия (2,2%).

Выводы.

По результатам проведенной в динамике детекции возбудителей вирусных инфекций у взрослых реципиентов почки после трансплантации органа установлено, что частота регистрации ЦМВ составила 41,9%, ВЭБ - 30,4%, ВКV - 17,4%, ВГЧ 6 - 5,6%, АдВ - 1,9% и ПВ В19 - 1,7%.

Кинетика развития доминирующих инфекций показала пик их регистрации в первые 3 месяца после трансплантации. Спустя шесть месяцев имело место снижение их частоты вплоть до выявления единичных случаев к 1 году наблюдения.

Вирусологическое обследование взрослых реципиентов почки с клиническими проявлениями инфекций и дисфункцией трансплантата показало доминирование вирусных осложнений, этиологически связанных с ЦМВ (24,4%), ВЭБ (18,8%) и ВКV (17,6%).

По результатам проведенной генодиагностики вирусных инфекций у детей-реципиентов почки установлено, что на фоне применения лекарственной профилактики ЦМВ инфекции не отмечено ни одного клинического случая ее проявления. В целом частота регистрации виремии в раннем посттрансплантационном периоде составила 20,0% (ВЭБ, ВГЧ 6, ВГЧ 7), в позднем – 8,0% (ВЭБ, ВГЧ 6, ВГЧ 7, АдВ), в условиях дисфункции трансплантата – 21,4% (ВГЧ 6). Согласно данным ПЦР исследований мочи ВКV и/или JCV вирурия регистрировалась у 40,0% реципиентов в раннем послеоперационном периоде, у 47,1% – в позднем и у 57,1% – у реципиентов с дисфункцией трансплантата. При этом в раннем периоде преобладали ВКV (22,9%), в позднем – JCV (36,8%). Среди детей с дисфункцией трансплантата ПВИ также была доминирующей и составила 57,1%.

Мониторинг ПВИ у детей после трансплантации почки выявил пик активации ВКV инфекции в первые 3 месяца после операции с последующим снижением частоты ее регистрации до 1 года и более. При этом пик регистрации JCV инфекции отмечался в первые недели после пересадки органа с постепенным снижением к 3 месяцу наблюдения и последующим ростом к 1 году и далее после операции.

Вирусологическое обследование детей и взрослых реципиентов ГСК выявило ПВИ у 53,1% детей и 39,1% взрослых. У детей ПВИ была представлена исключительно ВКV инфекцией (53,1%), у взрослых - преимущественно ВКV инфекцией (37,0%) и в небольшом проценте (8,7%) - JCV инфекцией.

Пик активации ВКV инфекции у детей приходился на период 2 недели-2,5 месяца после трансплантации ГСК, у взрослых – на 1 месяц с последующим снижением до 1 года. У 25,0% детей и 8,7% взрослых после трансплантации ГСК наблюдалась посттрансплантационная патология (геморрагический цистит, асимптоматическая гематурия), ассоциированная с ПВИ.

Представленные в настоящей работе данные являются результатом впервые проведенных в нашей стране исследований по проблеме вирусных осложнений у двух категорий пациентов с выраженной иммуносупрессией – реципиентов почки и ГСК.

Полученные результаты указывают на активное участие ряда вирусных агентов в развитии посттрансплантационных осложнений и диктуют необходимость их регулярного мониторинга в послеоперационном периоде для выработки адекватных схем проводимой терапии с целью профилактики тяжелых последствий вплоть до потери трансплантата.

Литература

- 1. Baldanti, F. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients / F. Baldanti, D. Lilleri, G. Gerna // J. Clin. Virol. 2008. Vol. 41, No. 3. P. 237-241. doi: 10.1016/j.jcv.2007.12.001.
- 2. Allen, U. Epstein–Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients / U. Allen, J. Preiksaitis // Am. J. Transplant. 2009. Vol. 9, suppl. 4. P. S87-S96. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02898.x.
- 3. The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs / E. Ramos [et al.] // Transplantation. -2009. Vol. 87, No. 5. P. 621-630.
- 4. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients / V. Erard [et al.] // Blood. 2005. Vol. 106. P. 1130-1132.
- 5. Progressive multifocal leukoencephalopathy with gastrointestinal disease in a pediatric kidney transplant recipient / M.T. Burke [et al.] // Pediatr. Transplant. -2013. Vol. 17, No. 5. P. 119-124.
- 6. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7 / K. Wada [et al.] // Microbiol. Immunol. -2009. Vol. 53, No. 1. P. 22-29.

VIRAL INFECTIONS AS A CURRENT PROBLEM IN THE TRANSPLANTATION OF ORGANS AND CELLS

T.V. Amvrosieva¹, Z.F. Bohush¹, E.P. Kishkurno², N.V. Paklonskaya¹, A.S. Arinovich¹, S.V. Baiko³

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology; ²Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education; ³Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The article presents data on the frequency of detection, etiology and the dynamics of the development of viral infections in recipients after kidney transplantation and hematopoietic stem cells (HSC). In adult kidney recipients, the dominant pathogens in the post-transplantation period were found out to be CMV (41.9%), EBV (30.4%) and BKV (17.4%). These pathogens were the most frequent etiological agents of viral complications in recipients with clinical manifestations of infectious pathology and transplant dysfunction - CMV (24.4%), EBV (18.8%) and BKV (17.6%). The dominant pathogens in children after renal transplantation were polyomaviruses. BKV and/or JCV viruria was registered in 40.0% of recipients in the early postoperative period and in 47.1% in the late postoperative period. BKV (22.9%) prevailed in the early postoperative period, and JCV (36.8%) did in the late postoperative period. Poliomaviral infection among the HSC recipients was registed in 53.1% of children and 39.1% of adults. The obtained results point out at a strong impact of some viral agents on posttransplantant complication developement and require their regular monitoring after transplantation to elaborate treatment that would prevent severe complications including allograft loss.

Keywords: transplantation, kidney, hematopoietic stem cells, viral infections, diagnosis, viral complications, polymerase chain reaction, children, adults.

Поступила 10.12.2018

ПАРЭХОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, Ю.А. Шилова

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

заболевания. Резюме. Парэховирусы (ПЭВ) способны вызывать сопровождающиеся различными клиническими проявлениями. В Республике Беларусь лабораторная диагностика парэховирусной инфекции (ПЭВИ) до недавнего времени не проводилась, сведения о ее распространенности и частоте вызываемых ей заболеваний отсутствуют. Целью исследования была лабораторная диагностика ПЭВИ у пациентов с различными клиническими диагнозами и установление молекулярно-генетических характеристик ПЭВ, циркулирующих на территории Республики Исследовался клинический материал от 831 пациента с симптомами кишечной, респираторной инфекции, нейроинфекций, а также пациентов с клиническими признаками неуточненной энтеровирусной инфекции, собранный с 2016 г. по октябрь 2018 г. Детекцию ПЭВ осуществляли методом ОТ-ПЦР-РВ, молекулярное типирование - секвенированием участка гена VP1. ПЭВ обнаруживались у 4,6% обследованных пациентов, в том числе среди пациентов с признаками кишечной инфекции с частотой 6,6%, респираторной – 4,4%, энтеровирусной инфекции (ЭВИ) – 4,6%. У пациентов с нейроинфекциями ПЭВ выявлены не были. Среди больных ПЭВИ преимущественно были дети первых 3-х лет жизни. На территории Республики Беларусь обнаружена ширкуляция серотипов ПЭВ. обладающих значительной генетической гетерогенностью: преобладали ПЭВ1 типа (84%), также выявлены ПЭВ4 (8%), ПЭВ3 (4%) и ПЭВ5 (4%).

Ключевые слова: парэховирусы человека, острая кишечная инфекция, острый гастроэнтерит, острая респираторная инфекция, неуточненная энтеровирусная инфекция, нейроинфекция.

Введение. Парэховирусы человека (ПЭВ) впервые были открыты в 1956 г. американскими учеными, которые отнесли их к группе вирусов ЕСНО и классифицировали как ЕСНО 22 и 23. В настоящее время их выделяют в отдельный род *Parechovirus* в составе семейства *Picornaviridae*, а описанные ранее как вирусы ЕСНО 22 и 23 относят к ПЭВ1 и ПЭВ2, соответственно. Всего на сегодняшний день идентифицировано 19 серотипов ПЭВ [1]. Наиболее широкое распространение в мировом масштабе получили ПЭВ1 и ПЭВ3. Парэховирусная инфекция (ПЭВИ), вызванная вирусами 1, 2, 4-8 типов, может протекать бессимптомно, или иметь признаки кишечной и/или респираторной инфекции. Тяжелые формы нейроинфекций (энцефалит, менингит, острый вялый паралич), а также фатальные сепсисоподобные заболевания новорожденных связывают с ПЭВ3. Данные филогенетического анализа показывают, что от общего предка парэховирусы человека отделились около 400 лет назад и имеют высокую скорость эволюции, что, наряду с их способностью вызывать тяжелые заболевания, позволяет относить ПЭВИ к эмерджентным инфекциям [1].

ПЭВ преимущественно вызывают спорадическую заболеваемость, однако они могут быть этиологическими агентами случаев групповой заболеваемости, эпидемий [1].

В Республике Беларусь ПЭВИ до недавнего времени не диагностировалась и исследования эпидемиологии ПЭВ ранее не проводились.

Целью настоящей работы была лабораторная диагностика ПЭВИ у пациентов с различными клиническими проявлениями и молекулярное типирование циркулирующих на территории Республики Беларусь ПЭВ.

Материалы и методы исследования. Исследовались пробы (n = 885) фекалий (63,1%), крови (6,8%), ликвора (26,2%), смывов носоглотки (3,2%), мочи (0,2%), патологоанатомического материала (0,6%) от пациентов (n = 831) с различными диагнозами, объединенных в пять групп: пациенты с признаками кишечной, респираторной, нейроинфекции, с клиническим диагнозом энтеровирусной инфекции (ЭВИ), а также пациенты с другими клиническими проявлениями, которые могли быть вызваны ПЭВИ (сепсис, гепатит, инфекционный мононуклеоз, неуточненная вирусная инфекция и др.), полученные из учреждений здравоохранения Республики Беларусь с 2016 г. по октябрь 2018 г.

Выделение РНК из проб проводили с помощью набора «Рибопреп», («Амплисенс», Россия); постановку реакции обратной транскрипции – с использованием набора «РЕВЕРТА-L» («Амплисенс», Россия).

Индикацию ПЭВ выполняли методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием взятых из литературных источников [2] и разработанных комплектов праймеров и зондов на амплификаторе RotorGene 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия). Серо- и генотипирование обнаруженных ПЭВ проводили методом секвенирования продуктов, полученных в ПЦР по методике, описанной ранее [3] с последующим анализом нуклеотидных последовательностей с помощью программных продуктов, открытых для свободного использования — MEGA6 [4] и BLAST [5]. Для филогенетической реконструкции использовали метод максимального правдоподобия (Махітиш Likelihood), достоверность топологии полученного древа оценивали на основе бутстреппинга (проанализировано 500 псевдорепликатов).

Результаты исследования и обсуждение. Системное изучение ПЭВ в Республике Беларусь было начато в 2016 г. Проведенный за этот период скрининг позволил обнаружить ПЭВ в 38 образцах фекалий: 13 ПЭВ в 2016 г.; 5 ПЭВ в 2017 и 20 ПЭВ в 2018 г. В целом ПЭВ обнаруживали в 4,6% пациентов, однако в группах пациентов с различными клиническими проявлениями частота обнаружения ПЭВ была различной (рисунок 1).



Столбчатая диаграмма – доля пациентов с выявленной ПЭВИ, график – количество исследованных проб пациентов

Рисунок 1. — Результаты диагностических исследований ПЭВ у пациентов с клиническими проявлениями кишечной инфекции, энтеровирусной инфекции, респираторной инфекции, инфекций ЦНС (инф. ЦНС), и других

ПЭВ, ассоциированные с диарейным синдромом, были обнаружены у 6,55% пациентов (n = 31, всего было обследовано 473 человека), среди которых пациенты с диагнозам острая кишечная инфекция (64,5%), острая респираторная инфекция (ОРИ) с кишечным синдромом (12,9%), острый гастроэнтерит (16,1%), острый энтерит (3,2%), острый энтероколит (3,2%). Сходные данные (1,6-6,16%) получены от исследователей ПЭВИ у детей с диарейным синдромом из Европы и России [6].

Зачастую ПЭВИ и ЭВИ могут проявляться сходным образом и клинически невозможно определить, какой из вирусов является этиологическим агентом [6]. В нашем исследовании у пациентов с клиническими признаками ЭВИ (обследованы 66 человек) ПЭВ встречались в 4,55% случаев (n = 3).

У пациентов с признаками респираторной инфекции ПЭВ обнаруживались с частотой 4,41% (n = 3). Известно, что ПЭВ способны вызывать гриппоподобные заболевания у детей: в исследованиях зарубежных ученых показано их наличие в пробах у 1,3-9% заболевших ОРИ [6].

У 162 пациентов с нейроинфекциями (менингит, менингоэнцефалит, менингеальный синдром, энцефалит), ПЭВ обнаружены не были. Это может быть связано с тем, что для детекции ПЭВ у данной группы пациентов был доступен преимущественно ликвор (144 пробы). Кровь и фекалии исследованы от 28 и 14 пациентов, соответственно. По данным литературных источников вирусная нагрузка при ПЭВИ в плазме крови в 10^3 - 10^4 раз больше, чем в ликворе и для таких пациентов, повидимому, предпочтительнее проводить диагностику в пробах крови [7].

В группе пациентов (обследованы 62 человека) с другими клиническими диагнозами, позволяющими предположить ПЭВИ (сепсис, гепатит, инфекционный мононуклеоз, неуточненная вирусная инфекция и др.) ПЭВ был выявлен только в пробе копрофильтрата (1,61%) от трехмесячного ребенка с клиническими признаками цитомегаловирусной инфекции.

В исследованных нами образцах ПЭВ обнаруживались преимущественно у детей первых трех лет жизни (89%) (рисунок 2). Известно, что ПЭВ является широко распространенным вирусом, заражающим младенцев с раннего возраста. Как показали исследования норвежских ученых, ПЭВ хотя бы раз за период наблюдения были обнаружены у 43% детей в возрасте до 12 месяцев и у 86% – до 24 месяцев жизни [8].



Рисунок 2. – Возрастная структура пациентов с ПЭВИ (в скобках приведено количество обследованных пациентов соответствующего возраста)

За период наблюдений обнаружение ПЭВ в течение года было не равномерным (рисунок 3).

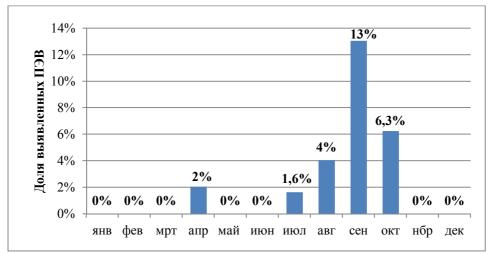


Рисунок 3. – Помесячная частота обнаружения ПЭВ в Республике Беларусь, 2016 г. - октябрь 2018 г.

Чаще ПЭВ выявлялись в конце лета и начале осени. Авторы некоторых исследований также указывают на преимущественно летнюю и осеннюю сезонность циркуляции ПЭВ, однако в других исследованиях показано, что для ПЭВ не характерна выраженная сезонность [6].

Для молекулярного типирования ПЭВ накапливали последовательности полного генаVP1, кодирующего основной капсидный белок ПЭВ, который характеризуется максимальной вариабельностью и локализацией в нем основных антигенных детерминант, определяющих серотип возбудителя. В результате проведенных исследований из 38 проб, в которых по результатам лабораторной диагностики присутствовали ПЭВ, удалось накопить 20 нуклеотидных последовательностей полного и 5 – фрагмента гена VP1.

Результатом филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей полного гена VP1 ПЭВ стала дендрограмма, представленная на рисунке 4. Из рисунка видно, что все анализируемые изоляты достоверно формировали монофилетические кластеры со своими прототипными штаммами каждого из серотипов ПЭВ 1, 3, 4, 5. Из 25 проанализированных изолятов 21 принадлежал к 1 типу (84%), $2 - \kappa$ типу 4 (8%) и $1 - \kappa$ типу 3 (4%) и $1 - \kappa$ типу 5 (4%).

Как было отмечено выше, наиболее многочисленным в нашей стране оказался ПЭВ1: 21 из 25 идентифицированных изолятов принадлежали этому же серотипу. В пределах серотипа выделяют 2 генотипа ПЭВ1а и ПЭВ1b [10]. Все идентифицированные в представленной работе изоляты принадлежали к генотипу ПЭВ1а. В пределах генотипа идентифицировали 4 геноварианта ПЭВ1а (обозначены овалами на дендрограмме), в состав которых входили как белорусские изоляты, так и вирусы, выделенные в других странах. Доля обнаруживаемых различий в нуклеотидных последовательностях отдельных геновариантов составляла 0-9,7%, максимальная доля различий между белорусскими изолятами в пределах генотипа ПЭВ1а составила 14,7%.

Единственный изолят ПЭВЗ № 14918, идентифицированный в наших исследованиях, имел 99,6% сходство с австралийским штаммом ПЭВЗ, принадлежащим к генетической линии Australia_2013-GL2015, вызвавшей многочисленные вспышки сепсисоподобного заболевания новорожденных в Австралии в 2013-2015 г.

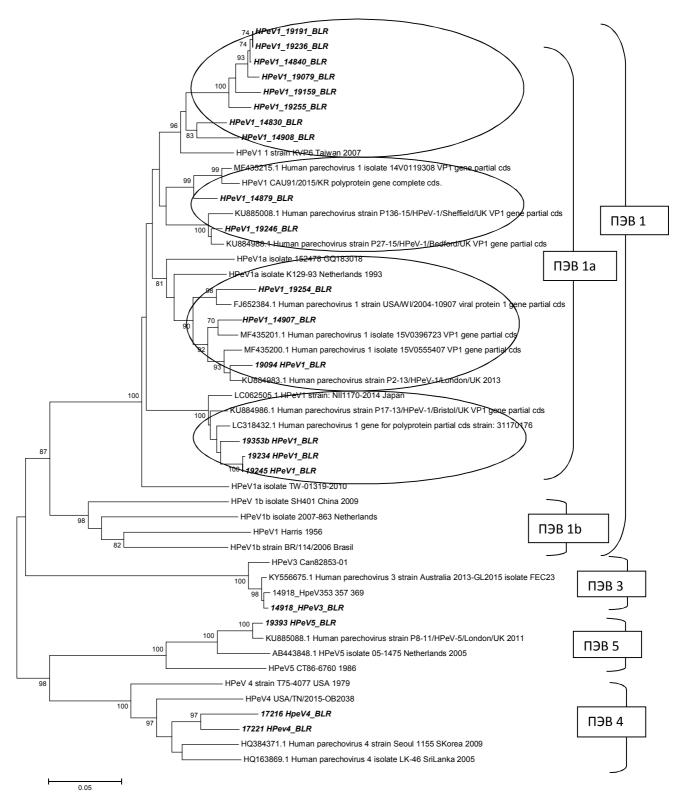


Рисунок 4. — Филогенетическая реконструкция по фрагменту гена VP1 ПЭВ методом neighbor-joining, модель эволюции TN93, гамма-распределение, α=0,5. Изоляты идентифицированные в исследовании выделены полужирным шрифтом

По результатам ранее проведенных исследований этой генетической линии, она возникла в результате множественных рекомбинаций. Часть генома, кодирующая капсидные белки получена от Yamagata 2011-подобного ПЭВЗ (линия Yamagata 2011 обладает повышенной вирулентностью по сравнению с другими ПЭВ 3 типа), а часть,

кодирующая неструктурные белки образовалась в результате множественных рекомбинаций неизвестных ПЭВ.

Два изолята ПЭВ4 (№№ 17216, 17221) достоверно группировались вместе, но при этом обладали значительной долей различий как между собой (6,5%), так и с ближайшими штаммами, выделенными в других странах: с наиболее близкими к ним штаммами, выделенными в Южной Корее в 2009 г. и Шри-Ланке в 2005 г. они имели 9,8-10,2% различий в нуклеотидной последовательности.

Единственный обнаруженный изолят ПЭВ5 №19393 обладал наибольшим сходством с вирусом, идентифицированным в Лондоне в 2011 г. (1,4% различий). Следует отметить, что изоляты ПЭВ5 по литературным данным достаточно редко обнаруживались в клиническом материале пациентов, и, соответственно, представлены крайне ограниченным количеством нуклеотидных последовательностей в международном генетическом банке.

Интересно отметить наличие ассоциативной связи отдельных генотипов с определенными клиническими проявлениями. Так, 95% изолятов ПЭВ1 и изолят ПЭВ5были выявлены у пациентов с симптомами ОКИ/острого гастроэнтерита, изоляты ПЭВ 4 серотипа обнаруживались у пациентов с подозрением на ЭВИ, преимущественно с симптомами экзантемы. Единственный изолят ПЭВ 3 серотипа был обнаружен у пациента с клиническими симптомами острой респираторной инфекции.

Заключение. ПЭВИ регулярно регистрируется на территории Республики Беларусь у пациентов с различными клиническими проявлениями. Общая доля пациентов с ПЭВИ составила 4,6%. Наиболее часто ПЭВИ регистрируется у пациентов с кишечной инфекцией (6,6%) и у пациентов с подозрением на ЭВИ (4,6%).

Идентифицировано 4 серотипа ПЭВ (1,3,4,5), установлена принадлежность всех изолятов ПЭВ1 к генотипу ПЭВ1а, среди которых показана циркуляция на территории Беларуси 4 различных геновариантов. Обнаруженный ПЭВ3 принадлежал к высоковирулентной генетической линии Australia_2013-GL2015, которая может представлять существенную опасность для новорожденных в связи с тяжелым течением инфекции, а также возможностью возникновения эпизодов групповой заболеваемости. Исходя из этого, диагностику ПЭВИ рекомендуется проводить на регулярной основе у новорожденных с признаками сепсисоподобного заболевания.

Литература

- 1. Olijve, L. Human parechovirus: an increasingly recognized cause of sepsis-like illness in young infants / L. Olijve, L. Jennings, T. Walls // Clin. Microbiol. Rev. 2017. Vol. 31, No. 1. doi:10.1128/CMR.00047-17
- 2. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR / W.A. Nix [et al.] // J. Clin. Microbiol. -2008. Vol. 46, No. 8. P. 2519-2524.
- 3. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing / W.A. Nix [et al.] // J. Clin. Virol. 2010. Vol. 48, No. 3. P. 202-207.
- 4. Basic local alignment search tool / S. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215. P. 403-410.
- 5. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725-2729.
- 6. Голицына, Л.Н. Парэховирусы человека / Л.Н. Голицына, В.В. Зверев, Н.А. Новикова. Н. Новгород: Типография «Растр-НН», 2017. С. 82.
- 7. Distinct systemic and central nervous system disease patterns in enterovirus and parechovirus infected children / H. Harvala [et al.] // J. Infection. 2014. Vol. 69, No. 1. P. 69-74.

- 8. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants / G. Tapia [et al.] // J. Med. Virol. 2008. Vol. 80, No 10. P. 1835-1842.
- 9. Evolutionary and network analysis of virus sequences from infants infected with an Australian recombinant strain of human parechovirus type 3 / S. Alexandersen [et al.] // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, No. 1. doi:10.1038/s41598-017-04145-2.
- 10. Comprehensive full-length sequence analyses of human parechoviruses: diversity and recombination / K.S.M. Benschop [et al.] // J. Gen. Virology. 2010. Vol. 91, No. 1. P. 145-154.

HUMAN PARECHOVIRUS INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

T.V. Amvrosieva, N.V. Paklonskaya, Y.A. Shilova

Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Human parechoviruses (HPeV) are capable of causing diseases that go with various clinical manifestations. In the Republic of Belarus, laboratory diagnostics of HPeV infection has not been being done until recently; there is no information about its epidemiology.

The goal of the study was to study the epidemiology and molecular genetic characteristics of HPeV that circulate in the Republic of Belarus.

Clinical material compiled in the period from 2016 to October 2018 was taken from 831 patients having clinical manifestations of acute gastroenteritis, respiratory and enterovirus infection (EVI), neuroinfections and other. HPeV was detected by real-time RT-PCR, genotyping was performed by sequencing the VP1 gene. HPeV was found in 4.6% of the examined patients, including patients with signs of intestinal infection with a 6.6%, respiratory infection – 4.4%, EVI – 4.6%. No HPeV was identified in patients with neuroinfections. Among the patients with HPeV infection were mainly children of 3 years old and younger.

Four serotypes of HPeV were defined to circulate on the territory of the Republic of Belarus: HPeV of the type 1 (84%) prevailed, and HPeV of the types 4 (8%), 3 (4%), 5 (4%) were also genotyped.

Keywords: human parechoviruses, acute gastroenteritis, acute respiratory infection, enterovirus infection, neuroinfection.

Поступила 10.12.2018

СЕРОСТАТУС ПАЦИЕНТОВ ИЗ ГРУПП РИСКА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Т.В. Амвросьева 1 , Ю.Б. Колтунова 1 , Е.П. Кишкурно 1 , А.А. Долголикова 2 , Л.В. Рубаник 1 , З.Ф. Богуш 1

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты серологических исследований сывороток крови пациентов 3 групп повышенного риска инфицирования вирусом гепатита E (ΓE), в которые вошли реципиенты почки, женщины с патологией беременности, пациенты с острым гепатитом неустановленной этиологии. Частота обнаружения IgM к вирусу ΓE в сыворотках крови (n = 99) пациентов всех трех групп (n = 99) составила 5,1%, IgG -12,1%. Наиболее высокие показатели были зарегистрированы в группе реципиентов почки (6,9% и 17,2% соответственно). Полученные данные свидетельствуют об активной циркуляции вируса ΓE среди населения Республики Беларусь и указывают на необходимость развития дальнейших исследований по данной мало изученной в нашей стране проблеме на популяционном и внешнесредовом уровнях.

Ключевые слова: гепатит Е, группы риска, иммуноферментный анализ, сыворотка крови, антитела.

Введение. Вирусный гепатит Е (ВГЕ) – зооантропоноз с фекально-оральным механизмом передачи. Его возбудителем является вирус гепатита Е (ГЕ). Таксономически он относится к семейству Hepeviridae роду Orthohepevirus [1]. В недалеком прошлом ВГЕ рассматривался в качестве инфекционного заболевания, эндемичного для стран с низким уровнем гигиены, а основным источником заражения считалась контаминированная вирусом питьевая вода. Однако в настоящее время установлено, что данная инфекция распространена, в том числе, и в высокоразвитых странах мира. Наиболее высокие показатели заболеваемости отмечаются в Восточной и Южной Азии, преимущественно в развивающихся странах [2, 3]. На эндемичных территориях инфекция регистрируется как в виде вспышек, так и виде спорадической заболеваемости. В неэндемичных районах вспышки, как правило, возникают в связи с неблагоприятной санитарно-гигиенической обстановкой, стихийными бедствиями, социальными и вооруженными конфликтами, в результате контаминации возбудителем воды или продуктов питания. Определенную роль в поддержании циркуляции вируса ГЕ играют и другие пути передачи, такие как переливание инфицированных продуктов крови, а также вертикальная передача от беременной женщины плоду [4].

В Европейском регионе эпидемическая ситуация по ВГЕ неоднородна. Эндемичными территориями являются южные области Франции (доля серопозитивных лиц – более 50%), Бельгия, Нидерланды, Великобритания, Люксембург, Германия, где доля серопозитивных лиц составляет 10-30%. Вместе с тем, территория Шотландии считается неэндемичной для ВГЕ (доля серопозитивного населения – менее 5%) [3].

В азиатском и африканском регионах в период 1988-2013 гг. ВГЕ был причиной около половины всех зарегистрированных случаев острого гепатита в Индии и 17 крупных вспышек в Африке [4, 5]. В 2015 г. по оценкам ВОЗ ВГЕ стал причиной около 44 тыс. случаев смерти (3,3% случаев смерти от всех вирусных гепатитов). С начала 2018 г. летальные исходы от данной инфекции были зафиксированы в Японии и Намибии. Показатель заболеваемости ВГЕ в азиатском регионе варьирует в пределах от

0,3% в Индии до 25% в республиках Средней Азии [6]. В России доля серопозитивного к вирусу ГЕ населения по результатам разных исследований может достигать 25-28% [7]. При этом в неэндемичных районах среди «условно» здорового населения различных возрастных групп (n = 6 292), данный показатель составляет 4,1%. При исследовании крови здоровых доноров маркеры возбудителя были обнаружены у 4% обследованных [8]. Все эти данные свидетельствуют о широкой циркуляции вируса ГЕ на территории Европы.

До недавних пор в Республике Беларусь ВГЕ был малоизвестной и недиагностируемой инфекцией, которая не подлежала официальной регистрации. Какие-либо данные о ее распространенности в стране и вкладе в этиологическую структуру вирусных гепатитов отсутствовали. Начатые в последние годы системные исследования [9, 10] позволили лабораторно подтвердить и зарегистрировать несколько случаев ВГЕ у населения (по 2 в 2017-2018 гг.). Вместе с тем, с учетом вышеприведенных литературных данных очевидно, что официальная регистрация далеко неполно отражает реальную ситуацию по заболеваемости ВГЕ и скрытой циркуляции возбудителя на территории республики. С этих позиций несомненный интерес представляют исследования, направленные на изучение серостатуса населения. Именно этой проблеме посвящена настоящая работа.

Цель: провести серологические исследования клинического материала пациентов, относящихся к разным группам повышенного риска инфицирования вирусом ΓE .

Материалы методы. Для выполнения исследований использовали сыворотки крови, полученные от пациентов различных учреждений здравоохранения Республики Беларусь, в том числе «Городская клиническая больница № 9» (n = 29) с клиническими диагнозами «острый гепатит неясной этиологии», «состояние после трансплантации органов», «гипертрансаминоземия», «патология беременности». Всего было проанализировано 104 пробы от 99 пациентов, составивших группы повышенного риска инфицирования вирусом ГЕ с учетом анамнезов их жизни и болезни.

Исследования осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на предмет выявления иммуноглобулинов M (IgM) и иммуноглобулинов G (IgG) к вирусу ΓE с использованием коммерческих тест-систем «Вектогеп-IgM» и «Вектогеп-IgG» производства «ВекторБест» ($P\Phi$) согласно инструкции производителя. Учет результатов производили спектрофотометрически.

Результаты и обсуждение. На основе анализа клинических диагнозов обследуемых пациентов и анамнестических данных были сформированы три опытные группы:

- реципиенты почки, получающие иммуносуппрессивную терапию (n = 29, средний возраст 40 лет; 58,6% мужчин, 41,4% женщин);
- женщины с патологией беременности, в т.ч. с беременностью, завершившейся выкидышем на ранних сроках (n = 44, средний возраст 34 года);
- пациенты с острым гепатитом неустановленной этиологии (ОГНЭ) на фоне гипертрансаминаземии и гипербилирубинемии (n = 26, средний возраст 31,3 года; 61,5% мужчин, 38,5% женщин).

При формировании данных групп учитывались также дополнительные факторы риска, такие как проживание в сельской местности, работа в сфере животноводства, пребывание в эндемичной по ВГЕ стране и др.

По результатам проведенной серодиагностики в группе реципиентов почки частота детекции IgM и IgG к вирусу ГЕ составила 6,9% и 17,2%, соответственно (таблица1).

Таблица 1. — Результаты исследования сывороток крови пациентов на антитела к вирусу Γ E (n = 99)

	Результаты серологического исследования							
	IgM	-	IgG					
Опытные группы	Число исследованных проб/из них положительных	Частота выявления, %	Число исследованных проб/из них положительных	Частота выявления, %				
Реципиенты почки	29/2	6,9	29/5	17,2				
Женщины с патологией беременности	44/3	6,8	44/5	11,4				
Пациенты с ОГНЭ	26/0	0	26/2	7,7				

В группе пациенток с патологией беременности, частота выявления IgM к вирусу ΓE составила 6,8%; IgG - 11,4%. В группе пациентов с ΓE IgM к вирусу ΓE не выявлялись, а частота обнаружения антивирусных IgG составила 7,7%.

В целом частота обнаружения IgG к вирусу ГЕ в сыворотках крови пациентов всех трех групп составила 12,1% (12 положительных проб), IgM — 5,1% (5 положительных проб). В 3 пробах (одного реципиента почки и 2 женщин с патологией беременности) были обнаружены антитела обоих классов, что составило 3% (рисунок).

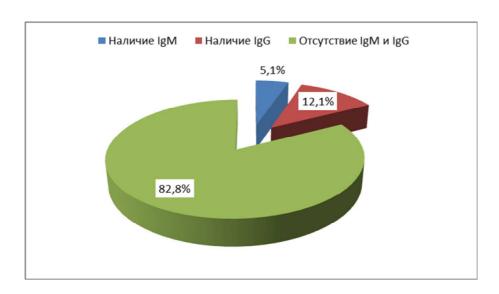


Рисунок – Частота обнаружения IgM и IgG к вирусу ГЕ в сыворотках крови пациентов из трех групп повышенного риска инфицирования вирусом ГЕ

Как известно, в условиях применения иммуносуппрессивной терапии у пациентов возникает высокий риск фульминантного течения ВГЕ. В связи с этим у реципиентов почки с положительным результатом обследования на антитела к вирусу Γ E (n = 5) был произведен повторный забор крови с интервалом от 2,5 до 5 месяцев (таблица 2).

У одного из пяти повторно обследованных серопозитивных реципиентов, во второй сыворотке, взятой через 5 месяцев, антитела к ВГЕ не определялись, у остальных – результаты исследования повторились.

Таблица 2. – Результаты серологического обследования пациентов при повторном заборе сыворотки крови.

$\mathcal{N}_{\!$	Первое иссл	едование	Второе исследование		Время между двумя
n/n	IgM	IgG	<i>IgM</i>	IgG	заборами крови
1	+	-	-	-	5 мес.
2	-	+	-	+	2,5 мес.
3	-	+	-	+	4 мес.
4	-	+	-	-	5 мес.
5	+	+	+	+	4 мес.

По современным представлениям IgM к вирусу ГЕ могут сохраняться в крови человека после заражения в течение 5-6 месяцев. Срок сохранения антивирусных IgG гораздо более длителен (до 15 лет). К сожалению, мы не располагали данными о времени контакта каждого из обследованных пациентов с возбудителем ВГЕ, что не позволяет до конца объяснить полученные результаты, особенно если учесть возможность развития у иммунодефицитных реципиентов нетипичной иммунной реакции на антигенный стимул (возбудитель).

Выводы.

Согласно результатам выполненного исследования сывороток крови (n = 99) пациентов из групп повышенного риска заражения вирусом ΓE серопозитивными в отношении антивирусных IgG оказались 12,1% обследованных, в отношении IgM -5.1%.

Наиболее высокая частота выявления маркера свежего инфицирования — IgM к вирусу ГЕ — была зарегистрирована в группе реципиентов почки, она составила 6,9%. При этом IgG были обнаружены у 17,2% обследованных. В двух других группах повышенного риска инфицирования данные показатели были ниже и колебались в пределах 7,7-11,4% и 0-6,8% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о реальной циркуляции вируса ГЕ среди населения Республики Беларусь. Они находятся в соответствии с накопленной в европейских странах информацией по данной проблеме и указывают на необходимость развития дальнейших исследований на популяционном и внешнесредовом уровнях.

Литература

- 1. Smith, D.B. Consensus proposals for classification of the family *Hepeviridae /* D.B. Smith, P. Simmonds // J. Gen. Virol. 2014. Vol. 95, Pt. 10. P. 2223-2232. doi: 10.1099/vir.0.068429-0.
- 2. Жаворонок, С.В. Острый автохтонный гепатит Е в Республике Беларусь / С.В. Жаворонок // Мед. журн. -2017. -№ 2. C. 132-134.
- 3. Hepatitis E virus infection [Electronic resource] / N. Kamar [et al.] // Nature Rev. Dis. Primers. 2017. Vol. 3. Article number: 17086. Mode of access: https://www.nature.com/articles/nrdp201786. Date of access: 12.03.2018.
- 4. Hepatitis E. Key facts [Electronic resource] / WHO. 19 Sept. 2018. Mode of access: http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e. Date of access: 20.09.2018.
- 5. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005 / D.B. Rein [et al.] // Hepatology. 2012. Vol. 55, No. 4. P. 988-997. doi: 10.1002/hep.25505.

- 6. In world first, woman's death linked to hepatitis E infection after blood transfusion at Japanese facility [Electronic resource] / JapanTimes News. 1 Feb. 2018. Mode of access: https://www.japantimes.co.jp/news/2018/02/01/national/world-first-womans-death-linked-hepatitis-e-infection-blood-transfusion-japanese-facility/#.WwQXhDSFPcs . Date of access: 12.03.2018.
- 7. Михайлов, М.И. Эпидемиология гепатита Е / М.И. Михайлов, К.К. Кюрегян // Гепатология. 2016. № 3. С. 6-17.
- 8. Гепатит Е в неэндемичном районе антитела к вирусу гепатита Е в различных группах населения / О.Е. Федорова [и др.] // Вопр. вирусологии. 1996. Т. 41, № 3. С. 104-107.
- 9. Амвросьева, Т.В. Современное состояние проблемы вирусного гепатита Е в мире и Республике Беларусь / Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, А.С. Аринович // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2017. Т. 6, № 4. С. 471-479.
- 10. Гепатит Е у беременных с патологией печени в Республике Беларусь / Т.В. Зновец [и др.] // Здравоохранение. -2016. -№ 5. -C. 9-15.

SEROLOGICAL STATUS OF PATIENTS FROM THE RISK GROUPS FOR THE VIRAL HEPATITIS E IN THE REPUBLIC OF BELARUS

T.V. Amvrosieva¹, Y.B. Kaltunova¹, E.P. Kishkurno ¹, A.A. Dolgolikova², L.V. Rubanik¹, Z.F. Bohush¹

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology; ²Minsk Research & Practical Center for Surgery, Transplantology & Hematology, Minsk, Belarus

The article presents the results of serological studies of blood sera of patients from three risk groups for the hepatitis E virus (HEV), which included kidney recipients, women with pregnancy pathology and patients with acute hepatitis of unknown etiology. The frequency of detection of IgM to the HEV in the sera (n = 99) of patients from all the three groups (n = 99) was 5.1%, while this of IgG was 12.1%. The highest frequency of antibodies detection was in the group of kidney recipients (6.9% for IgM and 17.2% for IgG).

The data obtained testify to the active circulation of HEV among the population in the Republic of Belarus and designate the need of further research of this infection at all levels.

Keywords: hepatitis E, risk groups, ELISA, blood serum, antibodies.

Поступила 16.11.2018

ГЕРПЕСВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА 6, 7 ТИПОВ И ИХ АССОЦИАЦИЯ С НЕВРОЛОГИЧЕСКОЙ И ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

*C.B. Орлова*¹, *А.А. Штыров*¹, *И.О. Стома*², *И.А. Карпов*²

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Резюме. Изучена встречаемость вирусов герпеса человека 6 и 7 типов (ВГЧ-6, ВГЧ-7) у пациентов с неврологической и онкогематологической патологией. Показано, что у пациентов с менингоэнцефалитом высокий процент ВГЧ-6, в 38% случаев регистрируется активная форма инфекции. В группе пациентов с острым лимфобластным лейкозом у 3 пациентов обнаружена ДНК ВГЧ-6 как в сыворотке, так и лейкоцитах, что указывает на одновременное присутствие вируса на стадии репликации, и в латентно/персистентном состоянии. Обнаружена ДНК ВГЧ-7 у большинства пациентов (17/21) с менингоэнцефалитом неустановленной этиологии. В группе пациентов с лимфобластным лейкозом был выявлен пациент с особой формой инфекции — хромосомно-интегрированной. Проведенные исследования показали, что активная форма ВГЧ-6 и ВГЧ-7 инфекции наиболее часто встречается при менингоэнцефалитах, причем ВГЧ-7 чаще, чем ВГЧ-6. Это может свидетельствовать о их роли в патогенезе этого заболевания

Ключевые слова: вирусы герпеса человека 6, 7 типов, ДНК, хромосомноинтегрированный вирус, менингоэнцефалит, лейкоз.

Введение. Вирусы герпеса человека 6 и 7 типов (ВГЧ-6, ВГЧ-7), выделенные в 1986 и 1990 гг. соответственно, относятся к подсемейству бета-герпесвирусам, к роду *Roseolavirus*, генетически близкородственны, имеют общие биологические и иммунологические характеристики, лимфо- и нейротропнытропны. Впервые ВГЧ-6 был выделен из крови пациента с лимфомой, а ВГЧ-7 – из Т-лимфоцитов здорового донора. Это обстоятельство свидетельствует о широком спектре распространения этих вирусов не только при различных патологиях, но и у здоровых людей. Полагали, что существует 2 подтипа ВГЧ-6 – ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. В 2012 г. согласно новой международной классификации получены доказательства, что это 2 разных вируса, и они являются самостоятельными таксономическими единицами. Наиболее часто встречается ВГЧ-6В, роль ВГЧ-6А в развитии какого-либо заболевания неизвестна. Клинические проявления первичной инфекции ВГЧ-6А описаны только в странах Центральной Африки [1-3].

инфекции ВГЧ-6 и ВГЧ-7 После первичной сохраняются латентно/персистентной инфекции пожизненно, могут активироваться под влиянием провоцирующих факторов иммуносупрессивных И сами обладают иммуномодулирующими свойствами. Форма инфекционного процесса может быть разной, либо латентно/персистентная, либо активная, В последнее время появились работы, показывающие что геном ВГЧ-6 может интегрироваться в хромосомы человека, при этом развивается особая форма инфекции хромосомно-интегрированная, Заболевание при этой форме протекает бессимптомно, но интегрированный вирус способен к реактивации. Для этой формы инфекции характерна постоянная высокая вирусная нагрузка, а также присутствие ДНК вируса в волосяных фолликулах и ногтях [3, 4].

Инфекции, вызванные ВГЧ-6 и/или ВГЧ-7, могут проявляться как самостоятельные, так и отягощать течение самых различных патологий. Первичное инфицирование обычно происходит в раннем детском возрасте. Сероэпидемиологические исследования показали, что 60-80% взрослого населения

имеют антитела к этим вирусам. Однако возможно повторное инфицирование или реактивация латентной инфекции [5].

После первичного заражения ВГЧ-6, ВГЧ-7 возможны несколько вариантов болезни: классической (Roseola infantum) возникновения развития ОТ ДО недифференцируемых заболеваний, сопровождающихся лихорадочным состоянием без видимого очага инфекции, различными неврологическими нарушениями, герпетическим менингоэнцефалитом и др. Было показано, что ВГЧ-6 и ВГЧ-7 обладают тропизмом к линиям глиобластомы и нейробластомы, хотя эти клетки поддерживают рост вируса менее эффективно, чем лимфоциты. Это является объяснением тому, что вирусы способны инфицировать ЦНС и вызывать энцефалиты и менингиты. Доказано, что эти вирусы могут инвазировать клетки ЦНС во время первичной инфекции [6, 7].

Ряд авторов показали, что клетки, инфицированные герпес вирусами 6 и 7 типов могут малигнизироваться и вызывать рост опухоли. Инфицированность ВГЧ-6 и ВГЧ-7 обнаруживают у 80% детей, больных острыми лейкозами. Персистенция вирусов в организме иммунодефицитных пациентов онкологического профиля может приводить к реактивации вируса, обуславливая активную форму инфекции [4].

Исследования по герпесвирусам проводятся интенсивно и многие из них достаточно хорошо изучены, но о свойствах ВГЧ-6 и ВГЧ-7 еще много неизвестного. Существуют сложности в дифференциации причины и следствия, необходимых для окончательного установления роли ВГЧ-6 и ВГЧ-7 в патогенезе этих заболеваний

Цель настоящей работы — изучить встречаемость ВГЧ-6 и ВГЧ-7 у пациентов с неврологической и онкогематологической патологией и частоту активации инфекции.

Для этого были сформированы группы пациентов с острым лимфобластным лейкозом и с менингоэнцефалитом, у которых наиболее вероятно присутствие бетагерпесвирусов как этиологического патогена или ко-инфицирования с основным заболеванием.

Материалы и методы. Исследуемый материал — кровь и спинномозговая жидкость — были получены от пациентов с острым лейкозом и менингоэнцефалитом неустановленной этиологии.

Забор периферической крови осуществляли по стандартной методике. Кровь забирали в два вакутейнера: для получения сыворотки и получения мононуклеарных клеток переферической крови (с ЭДТА-К2). Выделение лейкоцитарной массы проводили с помощью гемолитика (Амплисенс, Россия) согласно инструкции производителя.

Выделение генетического материала осуществляли набором «Рибо-преп» (Амплисенс, Россия). Качественный анализ выделенной ДНК проверяли с помощью постановки ПЦР на глобиновый ген с последующим электрофорезом в агарозовом геле. Качественное и количественное выявление ДНК ВГЧ-6 проводили наборами «ННV6-скрин-титр-FL» (Амплисенс, Россия) согласно инструкции производителя [8].

Для выявления ДНК вируса ВГЧ-7 использовали праймеры собственной разработки к гену U100.

Постановку ПЦР проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Автралия). Анализ продуктов амплификации осуществляли электрофорезом в 2,0 % агарозном геле с визуализацией на приборе Typhoon 9410 (Amersham Biosciences, Англия) в присутствии бромистого этидия.

Антитела IgG и IgM определяли непрямым ммунофлуоресценцентным тестом (Anti-HHV-6 IIFT, Medizinishe Labordiagnostika AG, Germany).

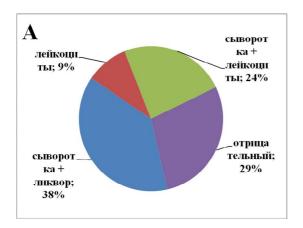
Результаты и обсуждение.

1. Выявление ДНК ВГЧ-6. Обследован 21 пациент с менингоэнцефалитом неустановленной этиологии и 19 пациентов с острым лимфобластным лейкозом.

Определяли маркеры герпесвирусной инфекции – ДНК ВГЧ-6, ДНК ВГЧ-7. Для определения разных форм инфекции детекцию ДНК и осуществляли в сыворотке (активная форма) и лейкоцитах крови (латентно/персистентная форма).

Проведены исследования по определению разных форм герпесвирусных инфекций. Критериями постановки диагноза активной формы герпесвирусной инфекции являются: присутствие ДНК герпесвирусов в ликворе сыворотке крови, IgM антитела, мРНК. Присутствие ДНК в лейкоцитах, отсутствие IgM антител свидетельствует о латентно/персистентной форме инфекции.

Показано, что у пациентов с менингоэнцефалитом высокий процент встречаемости маркеров бета-герпесвирусов. Так, в 38% случаев регистрировалась активная форма инфекции ВГЧ-6 и в 9% – латентная, у 5 пациентов (24%) ДНК ВГЧ-6 определяли как в сыворотке, так и в лейкоцитах (рисунок 1A).



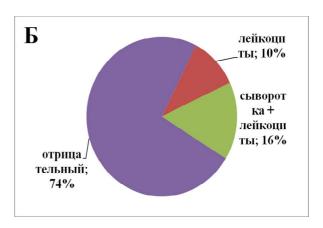


Рисунок 1. – Детекция генетического материала вируса герпеса 6 типа в клинических образцах пациентов с диагнозом менингоэнцефалит неустаноленной этиологии (A) и острым лимфобластным лейкозом (Б)

В группе пациентов с острым лимфобластным лейкозом определяли ДНК ВГЧ-6 в сыворотке и лейкоцитах (рисунок 1Б). У 3 пациентов выявлены ДНК ВГЧ-6 и в сыворотке, и в лейкоцитах (16,0%), что свидетельствует, об одновременном присутствии вируса, как в стадии репликации, так и в стадии латенции. Латентно/персистентную форму регистрировали у 10% пациентов. Присутствие ДНК ВГЧ-6 только в сыворотке крови не отмечено ни у одного пациента с острым лимфобластным лейкозом. Присутствие вируса не выявлено у 74% пациентов.

2. Выявление ДНК ВГЧ-7. Детекцию ДНК ВГЧ-7 проводили в клинических образцах исследуемых групп пациентов. При неврологической патологии у большинства пациентов 17/21 (80,9%) с менингоэнцефалитом неустановленной этиологии определяли ДНК ВГЧ-7 и у 4/21 (19,0%) не выявляли ДНК ВГЧ-7 в клинических образцах (рисунок 2A).

Активная форма моно инфекци ВГЧ-7 в группе пациентов присутствовали у 6 пациентов (29%) и у 8 пациентов (38%) – латентная форма.

У пациентов с острым лимфобластным лейкозом активацию ВГЧ-7 инфекций регистрировали в 11% случаев и в 26% – латентную форму (рисунок 2Б). Активную форму ВГЧ-7 инфекции регистрировали в большем проценте случаев, чем ВГЧ-6 инфекцию. Известно, что вирусные инфекции сопровождаются снижением защитных механизмов иммунной системы, что может приводить к активации ВГЧ-6 и ВГЧ-7 инфекции [4, 9].

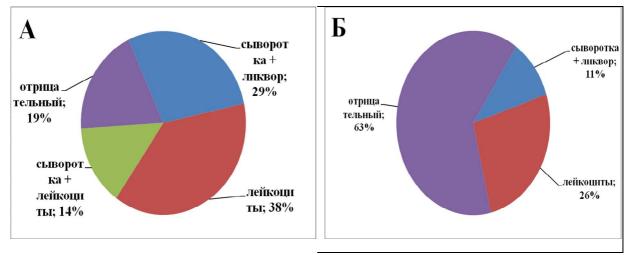


Рисунок 2. – Детекция генетического материала вируса герпеса 7 типа в клинических образцах пациентов с диагнозом менингоэнцефалит неустаноленной этиологии (A) и острым лимфобластоидным лейкозом (Б)

3. Хромосомно-интегрированная форма ВГЧ-6 инфекции. В группе пациентов с лимфобластоидным лейкозом выявлен пациент с особой формой инфекции – хромосомно-интегрированной. Это женщина с диагнозом основного заболевания – острый лимфобластный лейкоз. При поступлении в стационар помимо основного заболевания, у нее были герпетические высыпания, что послужило поводом диагностировать ВГЧ-6 и ВГЧ-7 инфекцию. При обследовании в стационаре герпесвирусы 3, 4 и 5 типов не обнаружены.

Первое исследование сыворотки и лейкоцитов крови показало наличие ДНК ВГЧ-6 и ВГЧ-7 (таблица). Было проведено лечение антивирусным препаратом и повторно взята кровь для диагностики ВГЧ-6 и ВГЧ-7 инфекции. В сыворотке и лейкоцитах крови детектировали ДНК ВГЧ-6, а ДНК ВГЧ-7 не определялась.

Таблица – Показатели хромосомно-интегрированной формы инфекции

Динамика	Время	Д	НК	Ct	IgM	IgG
исследования клинических образцов	наблюдения	ВГЧ-6	ВГЧ-7	копий/мл ВГЧ-6	титр к ВГЧ-6 нИФТ*	титр к ВГЧ-6 нИФТ*
При поступлении:	03.11.2017					
сыворотка		+	+	19,3	1:100	1:100
лейкоциты		+	+	4000		
После 1 курса	18.11.2017					
лечения:						
сыворотка		+	-	17,8	1:100	1:100
лейкоциты		+	-	4500		
После 2 курса	29.12.2017					
лечения:						
сыворотка		+	-	21,9	1:32	1:320
лейкоциты		+	-	4000		

Проведен 2-ой курс лечения антивирусным препаратом, и после этого ДНК ВГЧ-6 детектировали в сыворотке и лейкоцитах, что свидетельствует об отсутствии эффективности лечения. Известно, что хромосомно-интегрированная форма инфекции

ВГЧ-6 не поддается антивирусной терапии, что и показано в нашем исследовании [3, 4].

Уровень антител класса М определялся в разведении 1:10 со средней интенсивностью иммунофлуоресценции, что соответствует титру 1:100, в соответствии с инструкцией производителя (Anti-HHV-6 IIFT, Medizinishe Labordiagnostika AG, Germany). Через 56 дней титр IgM снизился и составил 1:32. Антитела IgG выявлялись в титре 1:100 – 1:320. Это свидетельствует о присутствии вируса в организме и его репликации. Количественное определение вирусной нагрузки показало высокое содержание вирусной ДНК. Уровень ДНК копий/мл составляло 4000 и не уменьшился после лечения.

После лечения ДНК ВГЧ-7 не выявляли. В настоящее время данных по интеграции ВГЧ-7 в хромосому человека практически нет, и полагают, что у него отсутствует ген ORF U 94, ответственный за интеграцию, но он есть у ВГЧ-6. Это позволяет предположить об интеграции вирусного генома ВГЧ-6 в теломерные концы ДНК клетки человека, обуславливая хромосомно-интегрированную форму инфекции.

Заключение. Изучена встречаемость ВГЧ-6 и ВГЧ-7 у пациентов с неврологической и онкогематологической патологией. Показано, что у пациентов с менингоэнцефалитом высокий процент встречаемости ВГЧ-6, в 38% случаев регистрировалась активная форма. В группе пациентов с острым лимфобластоидным лейкозом у 3 пациентов выявлены ДНК ВГЧ-6 и в сыворотке и в лейкоцитах, что свидетельствует, об одновременном присутствии вируса, как в стадии репликации, так и в стадии латенции. Определена ДНК ВГЧ-7 у большинства пациентов (17/21) с менингоэнцефалитом неустановленной этиологии.

У пациентов с острым лимфобластным лейкозом активацию ВГЧ-7 инфекций регистрировали в 11% случаев и в 26% — латентную форму. В группе пациентов с лимфобластным лейкозом выявлен пациент с особой формой инфекции — хромосомно-интегрированной. Проведенные исследования показали, что активная форма ВГЧ-6 и ВГЧ-7 инфекции наиболее часто встречается при менингоэнцефалитах, причем ВГЧ-7 чаще, чем ВГЧ-6. Это может свидетельствовать о их роли в патогенезе этого заболевания

Литература

- 1. Development of a new quantitative real-time HHV-6-PCR and monitoring of HHV-6 DNAaemia after liver transplantation / T. Karlssona [et al.] // J. Virol. Meth. 2012. Vol. 181. P. 25-36.
- 2. Никольский, М. А. Вирус герпеса человека 7 типа / М. А. Никольский // Инфекция и иммунитет. -2013. -№ 1. C. 15-20.
- 3. Никольский, М. А. Хромосомно-интегрированный вирус герпеса человека 6 типа / М. А. Никольский, В. С. Голубцова // Инфекция и иммунитет. 2015. № 1. С. 7-14.
- 4. A high circulating copy number of HHV-6 due to chromosomal integration in a child with acute lymphoblastic leukemia / O. Lohi [et al.] // Pediatric Blood & Cancer. 2010. Vol. 55, No. 6. P. 104-124.
- 5. Исаков, В.А. Герпесврусные инфекции человека / В.А. Исаков, Е.И. Архипова, Д.В. Исаков. СПб., 2013. 677 с.
- 6. The spectrum of acute encephalitis: causes, management, and predictors of outcome / T.D. Singh [et al.] // J. Neurovirol. 2015. Vol. 84. P. 359-366.
- 7. Association of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 with demyelinating diseases of the nervous system / V. Tomsone [et al.] // J. Neurovirol. -2001. Vol. 7, No. 6. P. 564-569.

- 8. Методические указания МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лаборатории, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». М., 2009.
- 9. HHV-6 and HHV-7 infection in chronic fatigue syndrome and multiple sclerosis patients / S. Chapenko [et al.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. Минск, 2009. Вып. 2. С. 17-21.

HUMAN HERPESVIRUSES 6, 7 TYPES AND THEIR ASSOCIATION WITH NEUROLOGICAL AND ONCOHEMATOLOGIC PATHOLOGY

S.V. Orlova¹, A.A. Shtyrov¹, I.O. Stoma², I.A. Karpov²

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The incidence of human herpes viruses 6 and 7 types (HHV-6, HHV-7) in patients with neurological and oncohematologic pathology was studied. Results obtained shown that in patients with meningoencephalitis a high percentage of HHV-6 (38% of cases) was recorded in the active form of the infection. In a group of patients with acute lymphoblastoid leukemia in 3 patients, HHV-6 DNA was detected in both serum and leukocytes, which indicates the simultaneous presence of the virus, both in the replication stage and in the latency stage. HHV-7 DNA was detected in the majority of patients (17/21) with meningoencephalitis of unknown etiology. In the group of patients with lymphoblastoid leukemia, a patient with a special chromosomal-integrated form of infection was identified. Studies have shown that the most common form of HHV-6 and HHV-7 infection is in meningoencephalitis, with HHV-7 more often than HHV-6, which may indicate their role in the pathogenesis of this disease.

Keywords: human herpes viruses 6, 7 types, DNA, chromosomal-integrated virus, meningoencephalitis, leukemia.

Поступила 03.12.2018

ВЫЯВЛЕНИЕ РНК ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА В КРОВОСОСУЩИХ КОМАРАХ И МОШКАХ, СОБРАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР

Т.И. Самойлова¹, А.Г. Красько¹, С.Е. Яшкова², Л.М. Рустамова¹, О.С. Залевская¹, В.Н. Шипуль¹, Ю.Б. Колтунова¹, О.В. Климович¹, С.А. Дракина¹, Л.С. Цвирко³

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»;

²ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск:

³УО «Полесский государственный университет», Пинск, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты выявления РНК вируса Западного Нила в кровососущих комарах и мошках, собранных на территории всех областей Республики Беларусь в 2017 г.

Ключевые слова: кровососущие комары, мошки, вирус Западного Нила, РНК, Беларусь.

Введение. Наряду с возбудителем клещевого энцефалита, наибольшую эпидемиологическую значимость среди арбовирусов для республики имеет вирус Западного Нила (3H) [1, 2]. Вирус 3H широко циркулирует на сопредельных с Республикой Беларусь территориях, а также в других странах [1, 3]. Переносчиками вируса являются кровососущие комары, клещи, а также имеются сведения о роли мошек в циркуляции вируса 3H [4].

В последние годы вирус ЗН становится все более агрессивным и вызывает заболевания и эпидемические вспышки даже в тех регионах, в которых он не был ранее известен [5-9]. На территории Беларуси вирус впервые был выделен и идентифицирован в 1985 г. от птиц на весеннем пролете на территории Петриковского района Гомельской области (штамм 48-ЗН Тремля). Позже вирус был изолирован от кровососущих комаров рода *Aedes* и из крови лихорадящего больного (штамм Вин), проживающего на территории Беловежской пущи Брестской области [1].

Ранее нами проводилось изучение зараженности кровососущих комаров и мошек вирусом 3H с помощью метода $И\Phi A$. Также проводили выделение вируса на перевиваемой культуре клеток и белых мышах. Выявление вируса 3H методом OT- Π ЦР нами проводится впервые.

Цель работы — выявление РНК вируса Западного Нила в кровососущих комарах и мошках, собранных на территории Республики Беларусь в 2017 г.

Материал и методы. Материалом для исследования служили кровососущие комары и мошки, собранные во всех областях республики за период 2017 г. Всего было взято для исследования 3992 экземпляра (82 биопробы комаров) 3-х родов: *Aedes, Anopheles, Culex* и 500 экземпляров (10 биопроб) мошек сем. *Simuliidae*. Комаров предварительно определяли до рода (С.Е. Яшкова). В биопробу брали 40-50 экземпляров кровососущих комаров одного рода, мошек – по 50 экземпляров.

Выделение РНК вируса 3H в кровососущих комарах и мошках проводили методом ОТ-ПЦР. Перед постановкой реакции ОТ-ПЦР проводили подготовку биопроб: биопробы кровососущих комаров и мошек отмывали фосфатным буферным раствором. Для приготовления суспензии членистоногих тщательно растирали и к гомогенатам добавляли фосфатный буферный раствор из расчета 0,5 мл на 10 комаров, 1 мл на 20 комаров и 1 мл на 50 мошек. Приготовленные из комаров и мошек суспензии перед постановкой ОТ-ПЦР хранили при температуре -70°С [10].

Выделение РНК вируса ЗН проводили с помощью реактивов «РИБО-преп» («Амплисенс», Москва). Вносили в пробирки раствора для лизиса, затем добавляли подготовленные пробы. Содержимое пробирок тщательно перемешивали на вортексе, центрифугировали и прогревали в термостате. Добавляли в пробирки раствор для преципитации, перемешивали на вортексе и центрифугировали. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель. Добавляли в пробирки раствор для отмывки 3, плотно закрывали крышки, осторожно промывали осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Центрифугировали на микроцентрифуге. Осторожно, не захватывая осадок, отбирали надосадочную жидкость. Добавляли в пробирки раствор для отмывки 4, плотно закрывали крышки и осторожно промывали осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Центрифугировали на микроцентрифуге. Осторожно, не захватывая осадок, отбирали надосадочную жидкость. Помещали пробирки в термостат для подсушивания осадка. Добавляли в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешивали на вортексе. Помещали в термостат, периодически встряхивая на вортексе. Пробирки с суспензиями центрифугировали на микроцентрифуге.

Реакцию обратной транскрипции проводили с набором реактивов «РЕВЕРТА-L» («Амплисенс», Москва). Отбирали необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл. До начала работы размораживали, тщательно перемешивали на вортексе RT-mix и RT-G-mix-1. Готовили реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix вносили 5 мкл RT-G-mix-1, тщательно перемешивали на вортексе и осаждали капли с крышки пробирки. К полученному раствору добавляли 6 мкл ревертазы, пипетировали 5 раз и перемешивали на вортексе. В приготовленные пробирки вносили по 10 мкл готовой реакционной смеси и по 10 мкл РНК-проб. Осторожно перемешивали на вортексе и осаждали капли с крышки пробирки. Ставили пробирки в термостат при 37°С на 30 мин.

Амплификацию осуществляли с помощью набора реактивов «АмплиСенс WNV-FL» (Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ результатов амплификации в режиме реального времени проводили с помощью программного обеспечения, используемого для амплификации прибора CFX96 Realtime system (Bio Rad, USA) [10, 11].

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования кровососущих комаров, собранных в природных очагах на территории всех областей республики, позволили выявить РНК вируса Западного Нила (таблица).

Таблица – Выявление РНК вируса Западного Нила в кровососущих комарах	Tof Drien-serve	DIII/ Preserve	. 'Dama II.		
	таолина – выявление	РПК ВИПУСА	і запалного п	ила в кровососу	чних комарах

	Кровососущие		Роды комаров							
Области	комари	bl	Aedes		Anophei	Anopheles		Culex		
	экз./биопр.	% +	экз./биопр.	% +	экз./биопр.	% +	экз./биопр.	% +		
Витебская	235/8	0	110/4	0	50/2	0	75/2	0		
Минская	700/14	7,14	200/4	0	300/6	0	200/4	25		
Могилевская	800/16	6,25	350/7	0	200/4	25	250/5	0		
Гродненская	517/10	10	217/4	0	-	-	300/6	16,7		
Брестская	830/16	0	200/4	0	230/4	0	400/8	0		
Гомельская	500/10	20	300/6	16,7	200/4	25	-	-		
г. Минск	410/8	0	260/5	0	50/1	0	100/2	0		
Всего по РБ	3992/82	6	1637/34	2,9	1030/21	9,5	1325/27	7,4		

Примечания: экз./биопр — в числителе — количество исследованных экземпляров, в знаменателе — число биопроб; % + — процент положительных проб.

Как видно из таблицы, зараженность кровососущих комаров вирусом 3H в целом по Республике Беларусь в 2017 г. составила 6%. Процент выявления РНК вируса 3H в кровососущих комарах по областям составил: по Могилевской -6,25; по Гродненской -10,0; по Минской -7,14; по Гомельской -20%. В Витебской, Брестской областях и г. Минске РНК вируса 3H не была обнаружена. В мошках РНК вируса 3H также не была выявлена.

Если рассматривать зараженность комаров по родам, то наибольший процент выявления РНК вируса 3H отмечен у комаров рода *Anopheles* – 9,5%. Процент положительных биопроб кровососущих комаров рода *Aedes* составил 2,9; рода *Culex* – 7,4 (рисунок 1).

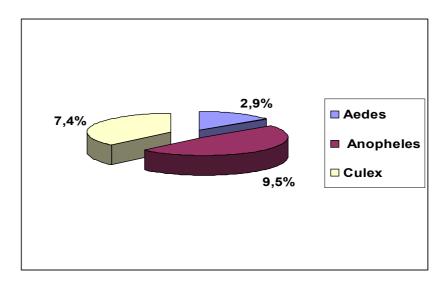


Рисунок 1. – Выявление РНК вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по родам

Процент выявления РНК вируса 3Н в кровососущих комарах всех родов по областям приведен на рисунке 2.

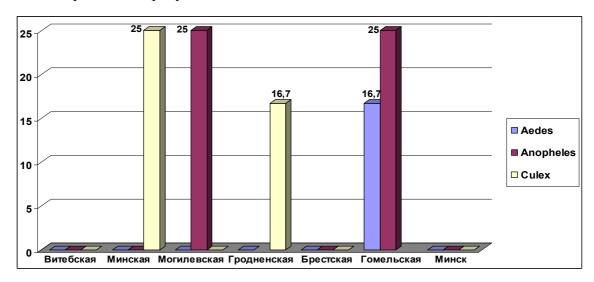


Рисунок 2. – Выявление РНК вируса 3H в комарах pp. Anopheles, Aedes, Culex по областям

Как видно из рисунка 2, наибольший процент выявления РНК вируса 3H в комарах рода *Anopheles* наблюдается в Гомельской (25%) и Могилевской областях

(25%). Комары рода *Aedes*, отловленные на территории Гомельской области, характеризуются высокой (16,7%) зараженностью вирусом ЗН. Наибольший процент выявления РНК вируса ЗН среди комаров рода *Culex* наблюдается на территории Минской (25%) Гродненской (16,7%) областей.

Заключение. На основании проведенного анализа зараженности кровососущих комаров и мошек Беларуси за период 2017 г., можно сделать вывод, что зараженность кровососущих комаров вирусом 3H остается на значимом уровне и составляет в среднем по Республике Беларусь 6%.

PHK вируса 3H обнаруживается в кровососущих комарах всех трех исследуемых родов (Aedes, Anopheles и Culex), но наибольший процент отмечается в комарах родов Anopheles и Culex.

Учитывая, что синантропные и полусинантропные роды комаров *Anopheles* и *Culex* обитают поблизости с жильем человека, инфицированные вирусом ЗН переносчики создают угрозу заражения людей этим возбудителем.

Литература

- 1. Самойлова, Т. И. Арбовирусы в республике Беларусь (полевые и экспериментальные исследования): дис. . . . д-ра мед. наук: 03.00.06, 14.00.30 / Т. И. Самойлова. Минск, 2003. 257 л.
- 2. Львов, Д. К. Лихорадка Западного Нила / Д. К. Львов // Вопр. вирусол. 2000. № 2. С. 4-9
- 3. Бурлаков, С.А. Комары и клещи переносчики возбудителей вирусных и риккетсиозных заболеваний человека / С.А. Бурлаков, В.Н. Паутов. М., 1975. 215 с.
- 4. Львов, Д. К. Арбовирусы и арбовирусные инфекции / Д. К. Львов, С. М. Клименко, С. Я. Гайдамович. М. : Медицина, 1989. С. 5-6.
- 5. Венгеров, Ю. А. Лихорадка Западного Нила / Ю. А. Венгеров, А. Е. Платонов // Лечащий врач. -2000. -№ 10. C. 56-60.
- 6. Hubalek, Z. West Nile fever a reemerging mosquito-born viral disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. 1999. Vol. 5. P. 643-650.
- 7. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses / J. S. Mackenzie [et al.] // Nature Med. 2004. Vol. 10, No. 12. P. 98-109.
- 8. Zeller, H. G. West Nile virus: an overiew of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas / H. G. Zeller, I. Schuffenecker // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2004. Vol. 23, No. 3. P. 147-156.
- 9. Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia / S. Paz [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public Health. $-2013.-Vol.\ 10.-P.\ 3543-3562.$
- 10. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов. М.: Бином. Лаб. знаний, 2009. 223 с.
- 11. Херрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / С. Херрингтон, Дж. Макгли. М.: Мед. книга, 1999. 433 с.

DETECTION OF THE WEST NILE VIRUS RNA IN BLOOD-SUCKING MOSQUITOES COLLECTED IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

T.I. Samoilova¹, A.G. Krasko¹, S.E. Yashkova², L.M. Rustamova¹, O.S. Zaleuskaya¹, V.N. Shypul¹, Y.B. Koltunova¹, O.V. Klimovich¹, S.A. Drakina¹, L.S. Tsvirko³

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology; ²Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk; ³Polessky State University, Pinsk, Belarus

In the article, the results obtained for the West Nile virus RNA detection in blood-sucking mosquitoes and buffalo gnats collected in Belarus in 2017.

Keywords: West Nile virus, RNA, OT-RNA, blood-sucking mosquitoes, buffalo gnats, Belarus.

ЗАРАЖЕННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ТЕРРИТОРИИ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Т.И. Самойлова¹, С.Е. Яшкова², А.Г. Красько¹, Л.М. Рустамова¹, В.Н. Шипуль¹, О.С. Залевская¹, О.В. Климович¹, С.А. Дракина¹, Л.С. Цвирко³, Т.А. Сеньковец³

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»;

²ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск;

³УО «Полесский государственный университет», Пинск, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты изучения зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита на территории Минской области в 2014-2018 гг.

Ключевые слова: иксодовые клещи, зараженность, вирус клещевого энцефалита, Минская область.

Введение. Среди арбовирусных инфекций наиболее значимой в эпидемиологическом отношении для Республики Беларусь является клещевой энцефалит (КЭ), основным переносчиком возбудителя которого является лесной клещ *Ixodes ricinus*. В последние годы отмечается рост зараженности иксодовых клещей вирусом КЭ и расширение ареала их обитания, что создает предпосылки для проведения ежегодного мониторинга зараженности переносчиков вирусом КЭ [1, 2].

Для изучения вирусофорности клещей в природных очагах в последние годы широко используется экспресс-метод иммуноферментного анализа (ИФА), имеющий высокую чувствительность и не уступающий методу биопробы на животных [3].

Цель работы — изучение зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита на территории Минской области в 2014-2018 гг.

Материал и методы. Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *I. ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранные на территории Минской области в 2014-2018 гг.

Методом ИФА было исследовано 628 экземпляров (110 биопроб) *I. ricinus* и 156 экземпляров (41 биопроба) *D. reticulatus* из природных очагов. Перед постановкой ИФА иксодовых клещей подвергали первичной биологической обработке. Клещей распределяли по биопробам в зависимости от места и даты сбора, вида, пола, стадии развития и степени насыщения. В одну биопробу брали 5-10 экземпляров голодных или полунапитавшихся самок; 5-10 голодных самцов; 2-3 напитавшихся самок или 50-100 нимф иксодовых клещей. Далее членистоногих отмывали 70% этиловым спиртом, фосфатным буферным раствором, растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии на фосфатном буфере (рН 7,0) с добавлением гентамицина [4]. Приготовленные из клещей суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса КЭ с использованием диагностических наборов фирмы Вектор-БЕСТ, согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований иксодовых клещей, собранных в природных очагах, антиген вируса КЭ в Минской области выявлялся в клещах $I.\ ricinus$ и в $D.\ reticulatus$ (таблица).

Как видно из таблицы, зараженность клещей *I. ricinus* выявлена на территории 12 обследованных районов Минской области (Борисовский, Мядельский, Молодеченский, Логойский, Вилейский, Минский, Воложинский, Столбцовский, Уздзенский, Солигорский, Слуцкий, Пуховичский), а *D. reticulatus* в 4 районах (Крупский, Солигорский, Пуховичский) Минской области.

Таблица — Характеристика заражённости иксодовых клещей антигеном вируса клещевого энцефалита на территории Минской области методом ИФА в 2014-2018 гг.

	Виды клещей									
Районы сбора	I. rici	nus	D. reticulatus							
	Количество экз./биопроб	% полож.	Количество экз./биопроб	% полож.						
Борисовский	46/5	20%	14/3							
Крупский			30/6	16,6%						
Мядельский	13/3	33,3%								
Молодеченский	44/8	12,5%	6/2							
Логойский	14/4	25%								
Вилейский	46/8	12,5%								
Минский	77/14	7,1%	3/2							
Дзержинский	62/12		7/2							
Смолевичский	8/2									
Червенский	10/2									
Воложинский	33/7	14,2%								
Столбцовский	38/6	33,3%	6/2							
Уздзенский	57/9	22,2%	6/2							
Солигорский	35/5	20%	11/5	20%						
Слуцкий	31/5	40%	10/2							
Пуховичский	22/4	25%	13/5	20%						
Копыльский	28/6									
Несвижский	28/4		10/2							
Клецкий	11/2		10/2							
Стародорожский	25/4		10/2							
Любанский			20/4	25%						
Всего	628/110	13,6%	156/41	9,7%						

На рисунке представлен процент зараженности клещей I. ricinus и D. reticulatus вирусом $K\mathfrak{I}$ по годам.

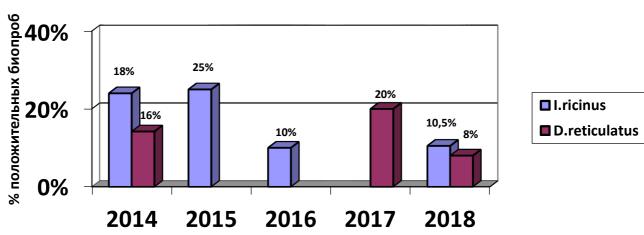


Рисунок – Выявление антигена вируса КЭ в клещах в Минской области, 2014-2018 гг.

Как видно из рисунка наибольшая зараженность отмечалась в 2015 г. у клещей $I.\ ricinus\ (25\%)$ и в 2017 г. – у клещей $D.\ reticulatus\ (20\%)$.

Заключение. В результате исследования клещей, собранных на территории Минской области и полученных данных можно сделать заключение о том, что уровень зараженности клещей $I.\ ricinus$ и $D.\ reticulatus$ сохраняется в настоящее время на достаточно высоком уровне и составляет в среднем по области $13,6\%\ I.\ ricinus$ и $9,7\%-D.\ reticulatus$.

Литература

- 1. Самойлова, Т.И. Современное состояние проблемы арбовирусных инфекций в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова // Вестник Уральской гос. мед. академии (Екатеринбург). 2010. Вып. 21. С. 133.
- 2. Львов, Д.К. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе / Д.К. Львов, В.И. Злобин // Вопр. вирусологии. -2007. -№ 5. C. 26-30.
- 3. Мельникова, О.В. Вирусологический мониторинг природных очагов КЭ в Прибайкалье на основании индивидуального исследования иксодовых клещей: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О.В. Мельникова. Томск, 1995. 25 с.
- 4. Методические рекомендации по выявлению циркуляции арбовирусов // Итоги науки и техники. Сер. Вирусол. М.: ВИНИТИ, 1991. Т. 25. 111 с.

INVESTIGATION OF IXODOIDEA TICK'S INFECTIOUSNESS BY TICK-BORNE ENCEPHLITIS VIRUS IN THE MINSK REGION TERRITORY

T.I. Samoilova¹, S.E. Yashkova², A.G. Krasko¹, L.M. Rustamova¹, V.N. Shypul¹, O.S. Zaleuskaya¹, O.V. Klimovich¹, S.A. Drakina¹, L.S. Tsvirko³, T.A. Senkovets³

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

²Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk;

³Polessky State University, Pinsk, Belarus

In the article the results of studies of ixodes tick's infectiousness by tick-borne encephalitis virus in the Minsk region territory, Belarus in 2014-2018 are presented.

Keywords: ixodes ticks, infection, tick-borne encephalitis virus, Minsk region, Belarus.

Поступила 10.12.2018

ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕГИОНАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2017-2018 гг.

Г.В. Семейко¹, И.Ф. Ухова¹, Н.В. Полякова¹, М.А. Ермолович¹, Е.О. Самойлович¹, С.И. Борисевич², Т.М. Горидовец³, С.А. Думова⁴, А.К. Стасюкевич⁵, Н.С. Цеханович⁶, Н.В. Колосюк⁷, Н.Л. Клюйко⁸, Е.М. Лосева⁹

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск; ²ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Брест; ³ГУ «Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Витебск; ⁴ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Гомель; ⁵ГУ «Гродненский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Гродно; ⁶ГУ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; ⁷ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»; ⁸УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница», Минск; ⁹ГУ «Могилевский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Могилев, Беларусь

Резюме. С использованием полугнездовой мультиплексной ОТ-ПЦР по двум генам (VP7, определяющим G-тип, и VP4, определяющим P-тип) проведено генотипирование ротавирусов из 213 образцов стула детей, проживающих в различных регионах Республики Беларусь, позволившее идентифицировать ротавирусы 11 генотипов: G3P[8] (54,9%), G2P[4] (15,5%), G9P[8] (6,6%), G1P[8] (6,1%), G4P[8] (4,2%), G3P[9] (3,3%), G12P[6] (0,9%), G3P[4] (0,9%), G2P[8] (0,5%), G9P[4] (0,5%), G4P[6] (0,5%). В 1,9% проб были обнаружены смеси ротавирусов нескольких генотипов. Генотипы, встречающиеся с частотой более 1% были отнесены к распространенным (G3P[8], G2P[4], G9P[8], G1P[8], G4P[8], G3P[9]), менее 1% – к редким (G12P[6], G3P[4], G2P[8], G9P[4], G4P[6]). Среди ротавирусов, являющихся межгрупповыми реассортантами (G2P[8], G3P[4], G9P[4]) два последних были выявлены в республике впервые. Ротавирусы генотипов G3P[9], G4P[6], G12P[6] могут иметь зоонозное происхождение, требуется дальнейшее их изучение.

Ключевые слова: ротавирус, полугнездовая мультиплексная ОТ-ПЦР, генотип.

Введение. Ротавирусная инфекция (РВИ) — это широко распространенная высококонтагиозная инфекция, возбудителем которой является ротавирус. Данный вирус принадлежат к роду *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, лишен липополисахаридной оболочки, имеет трехслойный капсид и сегментированный двухцепочечный РНК геном, кодирующий 6 структурных (VP1-VP4, VP6, VP7) и 6 неструктурных (NSP1-NSP6) белков. Генотип ротавируса имеет бинарную номенклатуру и определяется комбинацией генов VP7 (G генотип) и VP4 ([Р] генотип).

К настоящему времени идентифицировано 27 G и 37 [Р] генотипов ротавирусов, которые образуют более 80 G[Р] комбинаций [1]. В Европе более 90% случаев РВИ обусловлено 6 генотипами: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8], остальные комбинации в Европейском регионе относятся к редким, однако могут иметь большее эпидемическое значение в других регионах мира. Так, в Африканском регионе 37% случаев РВИ обусловлено генотипами G2P[6], G1P[6], G3P[6], G12P[6], G8P[6], G8P[4], G1P[4] [2].

Определение генотипа циркулирующих ротавирусов приобрело особую актуальность в связи с разработкой и внедрением вакцин против этой инфекции. К настоящему времени вакцинация внедрена в 95 странах мира. Для стран, которые еще не внедрили вакцину, чрезвычайно важно иметь данные о циркулирующих генотипах ротавирусов в довакцинальный период, что имеет большое значение для выбора

вакцины. После внедрения вакцинации важно оценить, произошла ли смена генотипического пейзажа ротавирусов, получили ли некоторые генотипы большее эпидемическое значение, вытеснив из циркуляции ранее доминирующие, и появились ли новые и необычные генетические варианты, а также реассортанты вакцинных штаммов.

Целью работы являлось выполнить генотипирование ротавирусов, циркулировавших в регионах Республики Беларусь за период ноябрь 2017 — июль 2018 гг., и оценить генетическое разнообразие циркулирующих генотипов вирусов.

Материалы и методы. Для установления генотипического пейзажа ротавирусов выполнен отбор 213 позитивных на ротавирус образцов стула от пациентов с лабораторно подтвержденным в ИФА (тест-система «РОТА-АГ» производства РНПЦ микробиологии и эпидемиологии) диагнозом ротавирусная инфекцияиз всех 7 регионов Республики Беларусь (Брестская область — 23, Витебская — 42, Гомельская — 25, Гродненская — 20, Минская — 24, Могилевская — 24, г. Минск — 55) за период ноябрь 2017— июль 2018 г. При этомв г. Минске и Витебской области пробы отбирались пропорционально числу зарегистрированных случаев ротавирусной инфекции в каждом месяце, в остальных регионах — по 3 образца в месяц.

Выделение РНК ротавирусов проводили из 10% суспензии проб стула с помощью автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAX Express с наборами 5XMagMAX-96 Viral Isolation kit (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Генотипирование выполняли по двум генам (VP4 и VP7) с использованием полугнездовой мультиплексной ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции [3]. Для выполнения обратной транскрипции и первой стадии ПЦР использовали набор QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Германия). Синтез ПЦР-продуктованализировали методом электрофореза в 3% агарозном геле в трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия.

Результаты и обсуждение. Выполненное генотипирование ротавирусов по VP7 и VP4 генам показало, что в период ноябрь 2017 – июль 2018 гг. спектр идентифицированных G[P]-типов включал 11 комбинаций: G3P[8] (54,9%), G2P[4] (15,5%), G9P[8] (6,6%), G1P[8] (6,1%), G4P[8] (4,2%), G3P[9] (3,3%), G12P[6] (0,9%), G3P[4] (0,9%), G2P[8] (0,5%), G4P[6] (0,5%). В 1,9% проб были обнаружены смеси ротавирусов нескольких генотипов, 9 образцов (4,2%) не удалось типировать с использованием OT-ПЦР, и для их дальнейшего изучения будет использовано секвенирование (рисунок).

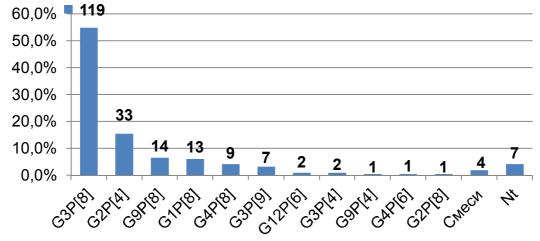


Рисунок – Генотипическое разнообразие ротавирусов, выявленных в Республике Беларусь в ноябре 2017 – июле 2018 гг. (n = 213)

встречающиеся с частотой более 1% были Генотипы, отнесены распространенным генотипам (G3P[8], G2P[4], G9P[8], G1P[8], G4P[8], G3P[9]), менее 1% – к редким (G12P[6], G3P[4], G2P[8], G9P[4], G4P[6]). На долю распространенных генотипов пришлось 90,6% выявленных штаммов ротавирусов. Генотип G3P[8] во второй раз (после 2011 г.) за многолетний период наблюдений в Республике Беларусь оказался доминирующим генотипом. Генотип G2P[4] оказался вторым по распространенности, это также наблюдается второй раз (после 2009 г.). Позиции 3 и 4 разделили генотипы G9P[8] и G1P[8], они встречались практически с одинаковой невысокой частотой (6,6% и 6,1% соответственно). Ранее генотип G1P[8] встречался гораздо чаще, хотя ни в один год наблюдения не являлся доминирующим в Республике Беларусь, в отличие от стран Европейского региона. Пятое место по частоте встречаемости занял генотип G4P[8] (4,2%), занимавший в течение многих лет лидирующие позиции. Частота встречаемости генотипа G3P[9] превысила 1%, что позволило исключить его из редких для Республики Беларусь генотипов. К редким генотипам за период ноябрь 2017 – июль 2018 гг. могут быть отнесены 5 комбинаций – G12P[6] (0,9%), G3P[4] (0,9%), G9P[4] (0,5%), G4P[6] (0,5%), G2P[8] (0,5%), все они встречались в единичных образцах. Следует отметить, что ротавирусы генотипа G3P[4] и G9P[4] были выявлены в республике впервые, и по сочетанию генов оба являются межгрупповыми реассортантами. Также межгрупповым реассортантом является ротавирус генотипа G2P[8].

Характеризуя региональное разнообразие ротавирусов, следует отметить, что число выявленных генотипов в среднем составляло 6, однако в отдельных регионах значительно различалось (по 4- в Витебской и Гродненской областях, 8- в Могилевской области). Только 2 генотипа — G3P[8] и G2P[4] — выявлялись во всех областях страны. Генотип G3P[8] являлся доминирующим, его удельный вес составлял от 45,2% в Витебской области до 70,9% в г. Минске. Удельный вес генотипа G2P[4] в различных областях значительно колебался — от 8,7% в Брестской области до 25% — в Гродненской (таблица). В отношении остальных генотипов наблюдались существенные различия в региональной структуре генотипов.

Таблица — Удельный вес генотипов ротавирусов в регионах Республике Беларусь за период ноябрь 2017 — июль 2018 гг.

Области			Распрост	раненные	?		Редкие	Смеси	Нетипи-
Ооласти	G3P[8]	G2P[4]	G9P[8]	G1P[8]	G4P[8]	G3P[9]	Геокие	Смеси	руемые
Брестская	52,2%	8,7%	8,7%	4,3%		8,7%	4,3%	4,3%	8,7%
Витебская	45,2%	14,3%	19,0%	16,7%			-		4,8%
Гомельская	64,0%	20,0%	4,0%	4,0%		4,0%	-		4,0%
Гродненская	45,0%	25,0%	10,0%		10,0%		5,0%		5,0%
Минская	45,8%	20,8%		4,2%	4,2%	8,3%	4,2%	4,2%	8,3%
Могилевская	45,8%	16,7%	4,2%	4,2%	8,3%	4,2%	12,5%	4,2%	
г. Минск	70,9%	10,9%		3,6%	7,3%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%
Всего	54,9%	15,5%	6,6%	6,1%	4,2%	3,3%	3,3%	1,9%	4,2%

В г. Минске лидирующее положение занимал генотип G3P[8] (70,9%); с существенно меньшей частотой обнаруживались еще 3 генотипа (G2P[4] (10,9%), G4P[8] (7,3%), G1P[8] (3,6%)), которые относятся к широко распространенным в Европейском регионе; был выявлен вирус редкого генотипа G9P[4] (1,8%), который ранее в Республике Беларусь не выявлялся. В других областях с достаточно высокой

частотой (более 15%) обнаруживались генотипы G2P[4] (25,0% — Гродненская область, 20,8% — Минская, 20,0% — Гомельская, 16,7% — Могилевская) и G9P[8] (19,0% — Витебская область).

Из генотипов, которые ранее встречались редко (частота встречаемости менее 1%) более широкое распространение получил генотип G3P[9]. Он выявлялся в целом по стране с частотой 3,3% и был выявлен в 5 из 7 регионов (8,7% – Брестская область, 8,3% – Минская, 4,2% - Могилевская, 4,0% – Гомельская, 1,8% – г. Минск). Как известно, этот генотип может иметь зоонозное происхождение[4]. Генотип G4P[6], обнаруженный в Брестской области (4,3%), и генотип G12P[6] – в Могилевской (8,3%), также могут иметь зоонозное происхождение, однако установить это можно лишь с помощью секвенирования и анализа вирусного генома.

Анализ данных литературы показывает, что появление межгрупповых реассортантов относится к редким явлениям [5], однако в Республике Беларусь за 9 месяцев наблюдения их было выявлено 4 (1,9%). Так, в Минской и Могилевской областях с частотой 4,2% выявлялись вирусы генотипа G3P[4]. Впервые вирусы с таким сочетанием генов были обнаружены в Японии в 2013 г., и также выявлялись в Германии в 2017 г., широкого распространения они не имеют и информации о них представлено крайне мало [6]. Также к редко встречающимся межгрупповым реассортантам относятся вирусы генотипа G2P[8] (выявлен в Гродненской области (5,0%) и G9P[4] (выявлен в г. Минске (1,8%)).

Заключение. Проведенное генотипирование 213 ротавирусов от пациентов из всех 7 регионов Республики Беларусь (Брестская область – 23, Витебская – 42, Гомельская -25, Гродненская -20, Минская -24, Могилевская -24, г. Минск -55) за период ноябрь 2017 г. – июль 2018 г. позволило идентифицировать ротавирусы 11 различных генотипов: G3P[8] (54,9%), G2P[4] (15,5%), G9P[8] (6,6%), G1P[8] (6,1%), G4P[8] (4,2%), G3P[9] (3,3%), G12P[6] (0,9%), G3P[4] (0,9%), G2P[8] (0,5%), G9P[4] (0,5%), G4P[6] (0,5%). В 1,9% проб были обнаружены смеси ротавирусов нескольких генотипов. Генотип G3P[8] являлся доминирующим, его удельный вес составлял от 45,2% в Витебской области до 70,9% в г. Минске. Генотипы, встречающиеся с частотой более 1%, были отнесены к распространенным генотипам (G3P[8], G2P[4], G9P[8], G1P[8], G4P[8], G3P[9]), менее 1% – к редким (G12P[6], G3P[4], G2P[8], G9P[4], G4P[6]). Генотипы G3P[4] и G9P[4] были выявлены в республике впервые, и по сочетанию генов оба являются межгрупповыми реассортантами. Также межгрупповым реассортантом является ротавирус генотипа G2P[8], который уже выявлялся ранее. Ротавирусы генотипов G3P[9], G4P[6], G12P[6] могут иметь зоонозное происхождение, требуется дальнейшее их изучение.

Литература

- 1. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijnssens [et al.] // Arch. Virol. 2011. Vol. 156, No. 8. P. 1397-1413.
- 2. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? / R. Dóró [et al.] // Infect. Genet. Evol. 2014. Vol. 28. P. 446-461.
- 3. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1992. Vol. 30, No. 6. P. 1365-1373.
- 4. Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains / J. Bwogi [et al.] // PLoS One. 2017. Vol. 22, No. 12. P. 0178855.

- 5. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network / M. Iturriza-Gómara [et al.] // Epidemiol. Infect. 2011. Vol. 139, No. 6. P. 895-909.
- 6. Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human–equine rotavirus reassortment event / R. Malasao [et al.] // Virus Genes. 2011. Vol. 50, No. 1. P. 129-133.

GENOTYPE DIVERSITY OF ROTAVIRUSES CIRCULATING IN THE REGIONS OF THE REPUBLIC OF BELARUSIN 2017-2018

G.V. Semeiko¹, I.F. Uhova¹, N.V. Poliakova¹, M.A. Yermoilovich¹, E.O. Samoilovich¹, S.I. Borisevich², T.M. Goridovets³, S.A. Dumova⁴, A.K. Stasyukevich⁵, N.S. Tsekhanovich⁶, N.V. Kolosyuk⁷, N.L. Kluyko⁸, E.M. Loseva⁹

¹Republican Research & PracticalCenterfor Epidemiology & Microbiology, Minsk; ²Brest Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Brest; ³Vitebsk Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Vitebsk; ⁴Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Gomel; ⁵Grodno Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Grodno; ⁶Minsk Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health; ⁷Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology; ⁸City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital, Minsk; ⁹Mogilev Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Mogilev, Belarus

Using semi-nesting multiplex RT-PCR for two genes (VP7, G-type and VP4, P-type), rotaviruses from 213 stool samples of children living in different regions of the Republic of Belarus, which allowed identifying 11 genotype rotaviruses: G3P [8] (54.9%), G2P [4] (15.5%), G9P [8] (6.6%), G1P [8] (6.1%), G4P [8] (4.2%), G3P [9] (3.3%), G12P [6] (0.9%), G3P [4] (0.9%), G2P [8] (0.5%), G9P [4] (0.5%), G4P [6] (0.5%). In 1.9% of samples, rotavirus mixtures of several genotypes were detected. Genotypes occurring with a frequency of more than 1% were attributed to common (G3P [8], G2P [4], G9P [8], G1P [8], G4P [8], G3P [9]), less than 1% - to rare (G12P[6], G3P[4], G2P[8], G9P[4], G4P[6]). Among the rotaviruses that are intergroup reassortants (G2P [8], G3P [4], G9P [4]), the latter two were identified in the republic for the first time. Rotaviruses of genotypes G3P[9], G4P[6], G12P[6] may be of zoonotic origin, their further study is required.

Keywords: rotavirus, semi-nesting multiplex RT-PCR, genotype.

Поступила 27.11.2018

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ HCV-ИНФЕКЦИИ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Т.А. Сергеева, Е.В. Максименок, М.Ю. Ватаманюк, В.Р. Шагинян ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского Национальной академии медицинских наук Украины», Киев, Украина

Резюме. Представлены результаты обнаружения специфических антител к вирусу гепатита С (анти-HCV) и генетического материала HCV при обследовании медицинских работников, оказывающих специализированную хирургическую помощь. Распространенность HCV-инфекции составила 1,84%, что выше, чем среди доноров крови и беременных за аналогичный период, однако ниже, чем частота обнаружения анти-HCV среди общего населения. У 57,14% серопозитивных по анти-HCV медработников одновременно определялась PHK HCV с высокой вирусной нагрузкой. Маркеры инфицирования HCV чаще выявлялись при обследовании врачей, преимущественно мужского пола, старшего возраста, с более длительным стажем работы. Несмотря на относительно невысокие показатели распространенности HCV-инфекции среди медработников, целесообразны их периодические обследования как с диагностической, так и профилактической целью.

Ключевые слова: медицинские работники, HCV-инфекция, маркеры инфицирования.

Введение. На сегодняшний день вопрос в отношении гепатита С (ГС) как профессионального медицинских работников уже не дискутируется и признан большинством специалистов [1, 2]. В последние годы в мире наметилась тенденция к увеличению числа случаев ГС у работников системы здравоохранения, и, несмотря на то, что возможность сероконверсии HCV среди этой профессиональной группы оценивается небольшими процентами (в развитых странах, по данным литературы, – от 0,42% до 1,0% [3, 4]) и считается статистически редкой, последствия HCV-инфекции для медицинских работников и системы здравоохранения весьма существенны, особенно при отсутствии средств специфической профилактики.

В Украине о собственно заболеваемости медицинских работников на ГС можно судить лишь по отдельным публикациям разных лет, но для оценки бремени НСV-инфекции большую информативность имеют данные о распространенности специфических маркеров инфицирования. Исследованиями прошлых лет показано, что частота обнаружения анти-HCV среди медицинских работников зависит как от профиля медицинского учреждения, отделения, так и от непосредственной профессиональной деятельности. В частности, одними из отделений, где медицинские работники подвергаются более высокому риску заражения HCV, являются отделения хирургического профиля [5].

Цель работы: оценить распространенность HCV-инфекции среди медицинских работников специализированных учреждений хирургического профиля г. Киева по результатам серологических и молекулярно-биологических исследований. Работа проводилась в рамках научно-практического сотрудничества Всеукраинской общественной организации «Остановим гепатит» и ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины», и в более широком плане цель состояла в расширении доступа сотрудников медицинских учреждений к специфическим обследованиям и противовирусной терапии.

Материалы и методы исследования. Работа проведена в формате поискового скрининга; группу обследованных составили 762 медицинских работника, в том числе 223 (29,3%) врача и 539 (70,7%) представителей среднего и младшего медицинского

персонала. Большая часть обследованных была представлена женщинами – 628 (82,52%); соотношение мужчин и женщин составил 1: 4,7, что, в определенной степени, соответствует гендерному распределению работников медицинских учреждений.

Определяли суммарные антитела к HCV (анти-HCV); первично позитивные результаты тестирования подтверждали по спектру антител к отдельным белкам возбудителя (соге, NS3, NS4, NS5). Для первичных и подтверждающих исследований использовали тест-системы и наборы реагентов «DIA-HCV» и «DIA-HCV-different» (АОЗТ НПК «ДиапрофМед», г. Киев, Украина.); «ИФА-АНТИ-HCV» и «ИФА- АНТИ-HCV-СПЕКТР» (НПО «Диагностические системы», г. Н. Новгород, РФ). Критерием позитивности при подтверждении была положительная реакция в ИФА не менее чем из 2-мя специфическими белками. ИФА проводили на стандартном оборудовании, имеющем надлежащую метрологическую поверку.

Для количественного определения уровня PHK HCV в образцах плазмы крови использовали тест-наборы «COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan HCV Test» (Roche, Франция). PHK HCV выделяли на приборе COBAS® AmpliPrep Instrument для автоматического выделения генетического материала из клеток плазмы крови. После окончания циклов выделения PHK пробы перемещали в прибор COBAS® TaqMan 48 Analyzer для автоматической амплификации и детекции генетического материала. Конечный результат получали в виде распечатки, содержащей информацию о наличии PHK HCV в образце плазмы или ее отсутствии. В соответствии с критериями оценки результатов исследования в тест-системе «COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan HCV Test», образцы плазмы крови, результаты исследования которых выше 43 IU/мл (4,3E + 01 IU/мл) считали достоверно содержащими генетический материал HCV.

Полученные результаты маркерного анализа сопоставляли с возрастом, полом, должностью, стажем работы в системе здравоохранения.

Результаты исследования. В результате серологического исследования было получено 14 подтвержденных позитивных результатов наличия анти-HCV, что составило (1,84±0,49)%. Возраст серопозитивных медработников колебался от 34 до 70 лет – в среднем (46,8±13,5) лет; 10 обследованных были женского пола в возрасте (51,9±12,4) лет; 4 – мужчины (45,5±16,7) лет. 9 лиц с анти-HCV были представителями среднего медицинского персонала (палатные, младшие медсестры, сестры реабилитационного и реанимационного отделения), 5 случаев обнаружения анти-HCV приходилось на врачей (реаниматолог, эндокринолог, хирурги). Стаж работы колебался от 3-х до 39 лет у медицинских сестер и от 11 до 44 лет – у врачей.

Несмотря на то, что наибольшее число серологических находок анти-HCV в абсолютных цифрах было среди медицинских сестер, при экстраполяции на общую численность представителей профессиональных групп обследованных, частота обнаружения специфических маркеров была выше среди врачей: $(2,24\pm0,99)\%$ против $(1,67\pm0,55)\%$ у среднего медицинского персонала, хотя различия не достигли статистической достоверности. В целом более инфицированными были мужчины — частота обнаружения анти-HCV составила $(3,00\pm1,48)\%$ против $(1,59\pm0,50)\%$ у женщин (различия недостоверны), что соответствует общей тенденции (среди мужчин серопревалентность HCV-инфекции больше).

Всего было получено 8 (1,05%) позитивных результатов выявления РНК НСV, и все они были у медработников с наличием анти-НСV (57,14%), возраст, пол, должность, стаж работы по специальности и вирусная нагрузка которых представлена в таблице.

В соответствии с критериями оценки результатов в тест-системе «COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan HCV Test» медицинские работники с наличием РНК

HCV имели достаточно высокую вирусную нагрузку. При этом пятеро не знали о своем инфекционном статусе, поскольку не отмечали ярких проявлений гепатита.

Таблица – Возраст, пол, должность, стаж работы медработников с наличием РНК HCV (по возрастанию уровня вирусной нагрузки)

$\mathcal{N}\!$	Возраст,	Пол	Должность	Стаж	Вирус	ная нагрузка
n/n	лет	110л	должноств	работы, лет	копий/мл	IU/ml
1.	52	Ж.	Врач реаниматолог	30	$7,89 \times 10^3$	7,89E+3IU/ml
2.	60	Ж.	Медсестра	30	$1,83 \times 10^4$	1,83E+4IU/ml
3.	?	Ж.	Медсестра	13	$3,41\times10^{4}$	3,41Е+4ІU/мл
4.	66	ж.	Младшая медсестра	3	$4,38 \times 10^4$	4,38Е+4ІU/мл
5.	61	ж.	Младшая медсестра	39	$2,46 \times 10^5$	2,46Е+5ІU/мл
6.	70	M.	Врач хирург	44	$2,10\times10^{6}$	2,10Е+6ІU/мл
7.	42	M.	Врач	13	$2,46 \times 10^6$	2,46Е+6ІU/мл
8.	64	Ж.	Младшая медсестра	17	$3,17\times10^{6}$	3,17Е+6ІU/мл

При тестировании образцов плазмы этих медицинских работников на антитела к отдельным белкам HCV методом ИФА у 5 из них был выявлен спектр антител ко всем белкам возбудителя (core, NS3, NS4, NS5), в 3-х – к белкам core, NS3 и NS4.

Медработники с наличием РНК HCV в среднем были в 1,5 раз старше, чем лица с только серологическими маркерами HCV-инфекции: $(59,29\pm18,7)$ против $(39,0\pm19,91)$ лет; имели больший стаж работы в здравоохранении – в 1,7 раз: $(23,63\pm16,06)$ против $(13,83\pm14,14)$ лет. Как и при анализе результатов обнаружения анти-HCV, РНК возбудителя инфекции чаще определяли у врачей – $(1,34\pm0,77)\%$ против $(0,93\pm0,41)\%$ у среднего медперсонала, однако различия не достигли статистически значимого уровня.

Обсуждение. Распространенность анти-HCV среди медицинских работников учреждений хирургического профиля сравнивали с аналогичными показателями, полученными при обследовании представителей «здорового» населения по результатам наших предыдущих исследований. Показано, что специфические антитела у медработников обнаруживались достоверно чаще, чем у кадровых (n = 425), первичных (n = 360) доноров, доноров — военнослужащих (n = 401) и беременных (n = 897) г. Киева в сопоставимый период времени (n = 1,5,2,6,6,1) раз), однако реже, чем в среднем по городу по результатам серологического мониторинга (n = 1,6,6,1) раз).

Ранее в Украине публиковались результаты обследования медицинских работников стационаров и отделений различного профиля в различных регионах Украины, и они отличались от полученных нами. Так, среди медработников Ровенской области (n = 2284) частота выявления анти-HCV была выше и колебалась от 2,96% у санитарок до 4,12% у медсестер, а при обследовании врачей серопревалентность НСУинфекции была меньшей и составила 3,13% [6]. Более высокой была инфицированность HCV медработников в г. Львове, по данным [7] - 7,2%, г. Запорожье -6,4% [8], в то время как в г. Сумы – наоборот, меньшей – 1,0% [9]. Однако в данных работах серопревалентность ГС рассматривалась без «привязки» к профилю оказания медицинской помощи. Что касается медицинских работников хирургического профиля, то по данным [10], в г. Харькове частота выявления анти-HCV все же была более высокой, по сравнению с нашими данными, составляя 3,06%, и этой группы авторами были отнесены к высшей профессионального риска заражения HCV. В результате обследования медицинских работников хирургического профиля г. Киева в более ранние годы анти-НСУ определялись у 5,3% из них, уступая по частоте лишь персоналу отделений

гемодиализа (8,9%) и гематологии и переливания крови (6,1%), а частота выявления антител на полученном нами уровне была характерна для персонала поликлинических и инфекционных отделений [5]. Как и в нашей работе, врачи чаще инфицировались HCV (6,6%), по сравнению со средним (5,4%) и младшим (2,6%) медицинским персоналом; наличие анти-HCV коррелировало со стажем работы.

Что касается РНК HCV, то по подобные исследования проводились в Ровенской области, и результаты обследования анти-HCV позитивных медработников на генетические маркеры инфекции в количественном плане были сходны с полученными нами: 58,43% [6].

Выводы.

- 1. При обследовании медицинских работников медицинских учреждений хирургического профиля г. Киева установлено, что распространенность HCV-инфекции среди этой группы профессионального риска составила 1,84%, что выше, чем среди доноров крови и беременных за аналогичный период, однако ниже уровня «усредненной серопревалентности» ГС среди населения города.
- 2. Наиболее пораженными HCV были врачи, преимущественно мужского пола, старшего возраста, с более длительным стажем работы по профессии.
- 3. Более чем у половины лиц с серологическими свидетельствами HCV-инфекции (57,14%) одновременно определялась PHK возбудителя на уровнях, свидетельствующих о высокой вирусной нагрузке.
- 4. Отмечаются региональные различия в серопревалентности HCV-инфекции среди медицинских работников, в том числе в учреждениях одного профиля.
- 5. Обследование медицинских работников на маркеры HCV (как и HBV) имеет не только диагностический смысл, но и выраженное профилактическое значение, поскольку позволяет своевременно выявлять больных и инфицированных лиц, что, в свою очередь, способствует своевременному дальнейшему клинико-лабораторному обследованию и соответствующему лечению, с одной стороны, а с другой ограничению их роли как возможных источников возбудителя и распространения инфекции как в условиях лечебно-профилактических учреждений, так и в других.

Литература

- 1. Sharps injuries amongst healthcare workers: review of incidence, transmissions and costs / M.M. Elseviers [et al.] // J. Ren. Care. 2014. Vol. 40, No. 3. P. 150-156.
- 2. The risk of HCV infection among health-care workers and its association with extrahepatic manifestations / A. Garozzo [et al.] // Mol. Med. Rep. 2017. Vol. 15, No. 5. P. 3336-3339.
- 3. The prevalence of hepatitis C among healthcare workers: a systematic review and meta-analysis / C. Westermann [et al.] // Occup. Environ. Med. 2015. Vol. 72, No. 12. P. 880-888.
- 4. Seroconversion rates among health care workers exposed to hepatitis C virus—contaminated body fluids: The University of Pittsburgh 13-year experience / F.M. Egro [et al.] // Am. J. Infect. Control. 2017. Vol. 25, No. 9. P. 1001-1005.
- 5. Марієвський, В.Ф. Епідеміологічна характеристика внутрішньолікарняних гепатитів В і С та стратегія їх профілактики в сучасних умовах: дис. ... д-ра мед. наук: 14.02.02. эпидемиология / В.Ф. Марієвський. Київ, 2006. 332 с.
- 6. Хоронжевская, И.С. Частота выявления гепатита С среди медицинских работников / И.С. Хоронжевская // VII Ежегод. Всерос. Конгресс по инфекционным болезням с междунар. участием, Москва, 30 марта 1 апр. 2015 г.: материалы конгресса. М., 2015. С. 354-355.

- 7. Ступінь інфікування вірусами гепатитів В і С медичних працівників м. Львова / Г.О. Потьомкіна [та ін.] // Клінічні проблеми боротьби з інфекційними хворобами: матеріали VI з'їзду інфекціоністів України, Одеса, 25-27 вересня 2002 р. Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. С. 426-427.
- 8. Севальнев, А.И. Эпидемиологические особенности парентеральных вирусных гепатитов в условиях крупного промышленного региона: дис. ... канд. мед. наук: 14.02.02 эпидемиология. Киев, 2005. 185 с.
- 9. Поширення парентеральних гепатитів на Сумщині / Ж.В. Хотинська [та ін.] // Труднощі діагностики і терапії інфекційних хвороб: матеріали Всеукраїнської науклиракт. конф. і пленуму Асоціації інфекціоністів України, Суми, 19-20 травня 2011 р. / ТДМУ. Тернопіль: Укрмедкнига, 2011. С. 70-71.
- 10. Малый, В.П. Вирусный гепатит С как профессиональная патология работников здравоохранения / В.П. Малый, М.Л. Чуйков // Междунар. мед. журн. − 2011.-№ 3.- C. 106-109.

SEROLOGICAL AND GENETIC MARKERS OF HCV-INFECTION IN HEALTH CARE WORKERS OF SURGICAL PROFILE

T.A. Serheieva, E.V. Maksimenok, M.Yu. Vatamaniuk, V.R. Shaginyan

L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The results of detection of specific antibodies against hepatitis C (anti-HCV) and HCV genetic material during the examination of medical personnel providing specialized surgical care presented. The prevalence of HCV infection was 1.84%, which is higher than that of blood donors and pregnant women over the same period, but is lower than the detection rate among the general population. In 57.14% of seropositive health care workers, HCV RNA with high viral load simultaneously detected. HCV infections markers more often detected in doctors, mainly male, older, with longer working experience. Despite the relatively low prevalence of HCV infection among health care workers, their periodic examinations, both diagnostic and prophylactic, are appropriate.

Keywords: health care workers, HCV-infection, markers of infection.

Поступила 20.11.2018

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ЗАЩИТНОГО УРОВНЯ АНТИТЕЛ К HBsAg У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ И СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Д.В Терешков¹, В.М. Мицура², Е.В. Воропаев², О.В. Осипкина², Н.М. Голубых²

¹УЗ «Гомельская областная инфекционная клиническая больница»;

²УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Резюме. Были изучены напряженность и длительность поствакцинального иммунитета против вируса гепатита В у 277 медицинских работников и студентов 6 курса медицинского университета. Полученные данные показали, что медицинские работники продолжают оставаться группой риска инфицирования вирусом гепатита В: 48,4% обследованных лиц не имели защитных титров антител. Напряженность иммунитета против вируса гепатита В зависит от возраста, среди медицинских работников старше 40 лет протективный иммунитет имеют только 37,2%. С увеличением срока, прошедшего после вакцинации, увеличивалась доля лиц, не имеющих протективного иммунитета. Количество лиц без защитных титров антител через 1-5 лет и более 15 лет после вакцинации составило 9,5% и 59,3% соответственно.

Ключевые слова: вирус гепатита В, медицинские работники, вакцинация, иммунитет, титры антител.

Введение. эффективных Несмотря наличие систем вакцинопрофилактики и противовирусной терапии, инфекция, вызванная вирусом гепатита В (ВГВ), остаётся глобальной проблемой здравоохранения. Около 2 миллиардов человек во всем мире имеют маркеры перенесенной или текущей инфекции, вызванной ВГВ, а более 257 миллионов человек (3,5% мировой популяции) являются хроническими носителями поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) с высоким риском прогрессирования заболевания печени, развития цирроза печени и гепатоцеллюлярного рака. Согласно имеющимся прогнозам, при отсутствии мер число людей, живущих с ВГВ, в ближайшие 40-50 лет сохранится на существующем высоком уровне; при этом в период 2015-2030 гг. от этого заболевания умрут 20 миллионов человек [1]. Наиболее эффективным методом профилактики инфицирования ВГВ Всемирная организации вакцинация. здравоохранения поголовную иммунизацию против гепатита В при рождении, которая традиционно включает введение 3 доз вакцины. Вакцинация против гепатита В считается безопасной и предупреждает передачу ВГВ в 80-95% случаев [2, 3]. В Республике Беларусь программа иммунизации против гепатита В стала внедряться с 1996 г., когда была начата вакцинация в «группах риска» (медицинские работники, дети, рожденные от матерей с ВГВ-инфекцией). С 2000 г. иммунизация против гепатита В включена в «Национальный календарь профилактических прививок», проводилась вакцинация всех новорождённых в первые 24 часа жизни и подростков в возрасте 13 лет, а с 2005 г. – студентов медицинских университетов с 4 курса и медицинских училищ со 2 курса. Введение вакцинации позволило за последние 10 лет снизить уровень заболеваемости острым гепатитом В в стране в 6 раз, однако остаётся устойчивая тенденция к росту хронической формы ВГВ-инфекции у взрослых [4].

В настоящее время остаётся ряд нерешённых проблем при использовании вакцин против гепатита В. У части вакцинированных детей (5-10%) наблюдается плохой ответ на вакцинацию, и они остаются восприимчивыми к заражению ВГВ. Пока точно не установлены причины недостаточной серопротекции, длительность поствакцинального иммунитета после первичной иммунизации, а также необходимость ревакцинации у взрослых [2, 3].

Медицинские работники относятся к группе риска профессионального заражения ВГВ, поэтому актуальна оценка состояния поствакцинального иммунитета у привитых. Уровень защитных антител к HBsAg (анти-HBs) 10 мМЕ/мл считается минимально необходимым для иммунной защиты против ВГВ. По данным российских коллег защитный титр анти-HBs через 5-10 лет после первичной иммунизации определялся у 80% медицинских работников [5]. В другом исследовании спустя 13 лет после стандартного курса вакцинации анти-HBs определялся лишь у 40,3% сотрудников [6]. Также установлено, что успех вакцинации и продолжительность напряженного иммунитета зависит от возраста [7]. Очевидно, решение о проведении ревакцинации должно приниматься индивидуально с учётом результатов тестирования на анти-HBs.

Цель: оценить напряженность иммунитета против вируса гепатита В у медицинских работников и студентов 6 курса медицинского университета.

Материалы и методы. Всего обследовано 277 человек, из них 214 сотрудников учреждения здравоохранения «Гомельская областная инфекционная клиническая больница» (врачи, средний и младший медицинский персонал, персонал отделения лабораторной диагностики) и 63 студента 6 курса учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет». Характеристика обследованных лиц: 244 женщин (88,1%) и 33 мужчины (11,9%) в возрасте от 20 до 70 лет, средний возраст в общей группе (М \pm σ) 36,8 \pm 13,5 лет (в группе медработников – 40,7 \pm 12,9 лет, студентов – 23,5 \pm 2,3 лет).

Количественный тест на уровень анти-НВѕ проводился методом иммуноферментного анализа. Использовались тест-системы «Вектор-БЕСТ» (Россия). Защитным считался уровень анти-НВѕ 10 мМЕ/мл и более. Уровень анти-НВѕ от 10 до 100 мМЕ/мл считался низким, 101-500 мМЕ/мл — средним и более 500 мМЕ/мл — высоким.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакетов MS Office Excel 2010 и Statistica 10. Для оценки данных использовались статистический критерий χ^2 , корреляционный анализ по Спирмену, анализ таблиц сопряженности методом Пирсона, анализ вероятности наступления изучаемого исхода в определенный период времени методом Каплана-Мейера, при исследовании различий в группах в зависимости от времени наступления исхода — F-критерий Кокса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез p=0,05.

Результаты исследования и обсуждение

Защитный уровень анти-HBs выявлен у 143 из всех 277 обследованных, что составило 51,6%. У 48,4% обследованных лиц протективный иммунитет к вирусу гепатита В отсутствовал. Из 143 обследованных с достаточным защитным титром антител низкий уровень анти-HBs (10-100 мМЕ/мл) имели 76 человек (53,1%), средний (101-500 мМЕ/мл) – 41 (28,7%) и высокий (более 500 мМЕ/мл) – 26 (18,2%).

При проведении корреляционного анализа по Спирмену выявлена обратная корреляционная связь между возрастом обследованных и уровнем анти-HBs (rs= -0,32, p<0,05). Обследованные лица распределены по возрастным группам: 20-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, старше 50 лет. Была изучена напряженость иммунитета в указанных возрастных группах, данные представлены в таблице 1.

Наименьший удельный вес лиц, имеющих защитный уровень анти-HBs, установлен в возрастных группах 40-49 лет и старше 50 лет (38,3% и 36,4% соответственно). В связи с этим мы сравнили напряженность иммунитета в возрастных группах 20-39 лет (164 человек) и старше 40 лет (113 человек). В возрастной группе старше 40 лет удельный вес лиц, имеющих защитный уровень анти-HBs был значимо ниже, чем в возрастной группе 20-39 лет – 37,2% и 61,6% соответственно ($\chi^2=15,9$, p<0,001). Медиана (нижний и верхний квартиль) титра анти-HBs у обследованных лиц

до 40 лет составила 23,8 (5,3; 174,5) мМЕ/мл, а после 40 лет - 4,0 (1,9; 20,3) мМЕ/мл. Зависимость напряженности иммунитета от возраста подтверждает и средний возраст обследованных лиц с титром анти-HBs ниже 10 мМЕ/мл. Средний возраст обследованных, не имеющих защитного титра антител, был выше, чем среди лиц с достаточной напряженностью иммунитета и составил $40,5\pm1,2$ и $33,3\pm1,0$ года соответственно.

Таблица 1. – Показатели напряженности иммунитета к вирусу гепатита В среди медицинских работников и студентов 6 курса медицинского университета в разных возрастных группах

		Уровень анти-HBs						
Возраст, лет	Всего обследовано	<10 N	<10 мМЕ/мл		МЕ/мл			
		абс.	%	абс.	%			
20-29	112	40	35,7	72	64,3			
30-39	52	23	44,2	29	55,8			
40-49	47	29	61,7	18	38,3			
>50	66	42	63,6	24	36,4			
Итого	277	134	48,4	143	51,6			

При изучении гендерных особенностей показателей иммунитета против вируса гепатита В, установлено, что протективный уровень анти-НВѕ имели 23 из 33 обследованных мужчин (69,7%) и 120 из 244 женщин (49,2%) (χ^2 =4,9, p=0,027). Медиана (нижний и верхний квартиль) титра анти-НВѕ у мужчин составила 38,2 (6,8; 101) мМЕ/мл, у женщин – 8,9 (2,6; 73,9) мМЕ/мл. Учитывая небольшое представительство мужчин в обследованной группе (11,9%), полученные данные требуют уточнения и дальнейших исследований на большей выборке.

Исследована частота обнаружения защитного уровня анти-HBs среди разных групп медицинского персонала и студентов 6 курса медицинского университета, данные представлены в таблице 2.

Установлено, что значительно чаще достаточный титр анти-HBs определяется у врачей (68,8%), а у младшего медицинского персонала лишь в 25% случаев (χ^2 =28,9, p<0,001). Не выявлено значимых различий при сравнении частоты выявления защитного титра анти-HBs у студентов (61,9%), как с медицинскими работниками в целом – 48,6% (χ^2 =3,5, p=0,06), так и с медицинскими работниками в возрасте до 40 лет – 60,1% (χ^2 =0,02, p=0,89).

Вакцинальный статус против вируса гепатита В известен у 216 обследованных лиц. Полный курс вакцинации прошли 184 человека (85,2%), сведения о введении двух доз вакцины имел 1 человек (0,5%) и одной дозы — 11 человек (5,1%), не получали вакцину 20 человек (9,2%). Стоит отметить, что у 3 медработников 53, 55 и 70 лет, которые не были вакцинированы, определялся протективный уровень анти-НВѕ в низком титре. Такие лица подлежат обследованию на антитела к сердцевинному антигену вируса гепатита В с целью определения признаков паст-инфекции или латентного течения заболевания. В целом среди вакцинированных у 115 человек (58,7%) отмечен достаточный защитный уровень анти-НВѕ, у 81 человека (41,3%) протективный иммунитет отсутствовал. Была изучена напряженность иммунитета к

вирусу гепатиту В среди вакцинированных лиц в разные сроки после вакцинации, данные представлены в таблице 3.

Таблица 2. – Показатели уровня иммунитета к вирусу гепатита В среди разных групп медицинского персонала и студентов 6 курса медицинского университета

Группа	Всего,		Уровень а	Медиана (нижняя и верхняя квартиль)		
обследованных	человек	<10 мМЕ/мл		≥10 м.	МЕ/мл	титра анти-HBs, мМЕ/мл
		абс.	%	абс.	%	3111233121
Врачи	32	10	31,2	22	68,8	56,8 (6,1; 275,8)
Сотрудники лабораторной службы	36	16	44,4	20	55,6	15,8 (2,4; 101)
Медицинские сестры	74	30	40,5	44	59,5	19,9 (4,6; 173,5)
Младший медицинский персонал	72	54	75,0	18	25,0	2,7 (1,5; 9,0)
Студенты	63	24	38,1	39	61,9	21,0 (6,8; 101)
Итого	277	134	48,4	143	51,6	11,7 (2,8; 95,0)

Таблица 3. – Показатели поствакцинального иммунитета в разные сроки после вакцинации

Спом но ото			Уровень с	Медиана (нижняя и верхняя квартиль) титра анти-НВs,		
Срок после вакцинации,	Обследовано, человек	<10 мМЕ/мл			≥10 мМЕ/мл	
лет		абс.	%	абс.	%	мМЕ/мл
1 – 5	21	2	9,5	19	90,5	101 (58,5; 384,9)
6 – 10	115	48	41,7	67	58,3	19,7 (5,0; 96,9)
11 – 15	33	15	45,5	18	54,5	14,7 (3,6; 135,2)
Более 15	27	16	59,3	11	40,7	6,2 (2,2; 32,1)
Итого	196	81	41,3	115	58,7	20,1 (4,5; 122)

Установлено, что через 1-5 лет после вакцинации не имели защитного уровня антител 9,5% привитых, через 6-10 лет и 11-15 лет -41,7% и 45,5% соответственно, а у вакцинированных более 15 лет назад протективный иммунитет отсутствовал в 59,3% случаев. Медиана (25%; 75%) титра анти-HBs у лиц, которые были вакцинированы менее 5 лет назад, составила 101 (58,5; 384,9) мМЕ/мл, у привитых более 15 лет назад -6,2 (2,2; 32,1) мМЕ/мл. При проведении корреляционного анализа по Спирмену выявлено, что с увеличением времени, прошедшим после вакцинации, снижается уровень анти-HBs (rs=-0,21, p=0,047).

Для оценки скорости снижения титра анти-HBs ниже протективного уровня в определенный период времени после вакцинации проведен анализ по методу Каплана-Мейера (рисунок 1).

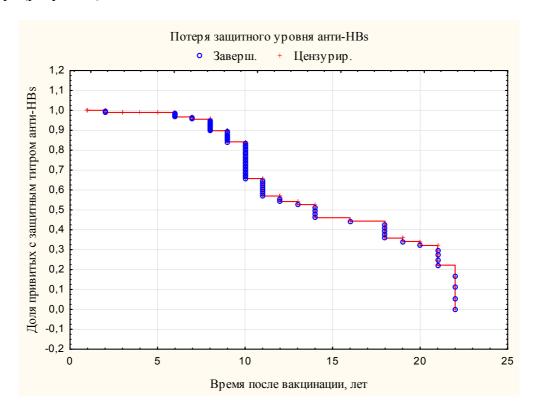


Рисунок 1 — Анализ вероятности потери защитного уровня анти-HBs в определенный период времени после вакцинации

Определена медиана времени выживания (период времени, в течение которого титр анти-HBs снизится ниже протективного уровня у 50% вакцинированных), а также нижний и верхний квартили кривой дожития, которые составили 14 (10; 21) лет.

Далее мы оценили гендерные различия по времени до потери защитного уровня анти-HBs, используя F-критерий Кокса (рисунок 2).

Статистически значимых различий по времени до потери протективного иммунитета к вирусу гепатита B между мужчинами и женщинами не было выявлено. Медиана времени до потери защитного уровня анти-HBs у женщин составила 14 лет, у мужчин — 10 лет, F-критерий Кокса составил 1,52, p=0,1.

Выводы. Протективный иммунитет против вируса гепатита В имеют 51,6% медицинских работников и студентов 6 курса медицинского университета, из них более половины (53,1%) имеют низкий титр анти-HBs. У 48,4% обследованных лиц отсутствует достаточный защитный уровень антител, что несет потенциальный риск их профессионального инфицирования. Не выявлено значимых различий при сравнении частоты выявления защитного титра антител у медицинских работников и студентов. Значительно чаще достаточный титр антител определяется у врачей (68,8%), а у младшего медицинского персонала – лишь в 25% случаев.

С увеличением возраста показатели напряженности иммунитета к вирусу гепатита В снижаются. В возрастной группе старше 40 лет удельный вес лиц, имеющих защитный уровень анти-HBs, значимо ниже (37,2%), чем у лиц до 40 лет (61,6%). Защитный титр антител имели 69,7% обследованных мужчин и 49,2% женщин.

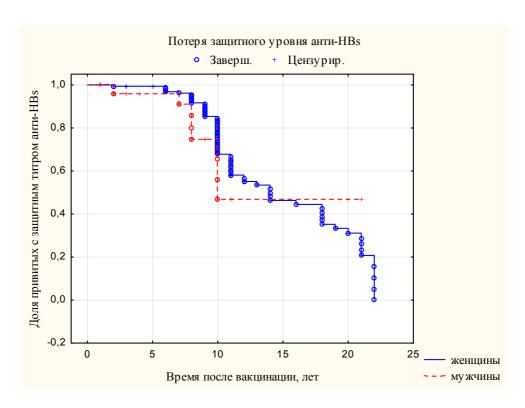


Рисунок 2 — Анализ времени до потери протективного иммунитета к вирусу гепатита В в зависимости от пола

Полный курс вакцинации прошли 85,2% медицинских работников и студентов, еще 5,6% имели сведения о введении 1 или 2 доз вакцины, 9,2% оказались не привиты. У 58,7% вакцинированных выявлен достаточный протективный уровень антител, который, однако, снижается с увеличением времени, прошедшим после вакцинации. Через 1-5 лет после вакцинации не имели защитного уровня антител 9,5% привитых, у вакцинированных более 15 лет назад протективный иммунитет отсутствовал в 59,3% случаев. Медиана времени до потери защитного уровня анти-НВѕ по Каплану-Мейеру составила 14 лет, гендерных различий по данному показателю не выявлено.

Необходим полный охват вакцинацией медицинских работников против вируса гепатита В со строгим соблюдением схемы иммунизации, а также разработка персонализированного подхода к ревакцинации.

Литература

- 1. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017.
- 2. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs / S. Locarnini [et al.] // J. Hepatol. 2015. Vol. 62. P. 76-86.
- 3. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Geneva: WHO, 2015. 166 p.
- 4. Организация вакцинопрофилактики гепатита В / Н.Д. Коломиец [и др.] // Актуальные вопросы гепатологии: материалы 10-го Междунар. симпоз. гепатологов Беларуси, Гродно, 26-27 сент. 2013 г. / под ред. В.М. Цыркунова. Гродно: ГрГМУ, 2013. С. 72-74.
- 5. О поствакцинальном иммунитете против вирусного гепатита В у медицинских работников Санкт-Петербурга / 3.П. Калинина [и др.] // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 89—92.

- 6. Оценка эффективности поствакцинального иммунитета при повторных введениях вакцины против гепатита В / А.В. Сергеева [и др.] // Медицинский альманах. -2010. № 2. С. 251-253.
- 7. Оценка эффективности вакцинации медицинских работников против гепатита В / В.Ф. Мариевский [и др.] // Профілактична медицина. 2011. № 2. С. 35-39.

SPECIFIC IMMUNITY AGAINST HEPATITIS B VIRUS IN HEALTHCARE WORKERS AND STUDENTS OF THE MEDICAL UNIVERSITY

D.V. Tserashkou¹, V.M. Mitsura², E.V. Voropaev², O.V. Osipkina², N.M. Golubyh²

¹Gomel Regional Infectious Clinical Hospital;

²Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

The intensity and duration of post-vaccination immunity against hepatitis B virus (HBV) was studied in 277 healthcare workers and the 6th-year students of the medical university. The data obtained showed that healthcare workers continue to be a risk group for HBV infection: 48.4% of examined individuals didn't have protective levels of antibodies. The specific immunity against HBV depended on the age; among healthcare workers over 40 years of age only in 37.2% had protective immunity. Depending on the period, that has passed after vaccination, the proportion of individuals without protective immunity against HVB increased. The proportion of persons without protective antibody levels after 1-5 years and more than 15 years after vaccination was 9.5% and 59.3% respectively.

Keywords: hepatitis B virus, healthcare workers, vaccination, immunity, antibody levels.

Поступила 20.11.2018

ИММУНОЛОГИЯ

Оригинальные исследования

ИЗМЕНЕНИЯ В АХИТЕТОНИКЕ АСТРОЦИТОВ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ IN VITRO АМИЛОИДНЫМИ β-ПЕПТИДАМИ, ФОРМИРУЮЩИМИСЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А.Н. Асташоно κ^1 , 3.Б. Квачева 2 , Н.Н. Полещу κ^1

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

Резюме. Из аутопсийного материала (ткани мозга) людей, умерших от болезни Альцгеймера, выделены патологические белковые компоненты (β-амилоиды Аβ1-40, Ав1-42). Проведен наноскопический анализ культуры нейроглиальных клеток крысы С6 и охарактеризованы параметры поверхностной микроархитектоники астроцитов при внесении олигомерных форм Аβ-амилоидов. Выявлены различия в количестве рецепторных кластеров и разнородности их распределения (параметры Ra, Rq), а также в модуле жесткости и упругости цитоплазматической мембраны, трансформированных Полученная модель позволяет проводить оценку модификационных преобразований клеток макроглии ЦНС при действии различных наноразмерных патологических форм Аβ-амилоидов, а также расширяет знания о дисрегуляторных патологических процессах, связанных с реактивацией астроглии при болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, β-амилоиды, культура Сб, наноскопический анализ, модуль Юнга, электронная микроскопия.

Введение. Астроцитарная глия — самый многочисленный компонент ЦНС, играет важную роль в нейрогенезе, и, являясь составной частью гематоэнцефалического барьера, поддерживает как ионный гомеостаз, так и обеспечивает селективный транспорт трофических факторов и других нейромедиаторов [1]. При болезни Альцгеймера (БА) и ряде других нейродегенеративных процессов астроциты вовлекаются в патологический процесс, претерпевая ряд структурно-модификационных преобразований (появление амебоидной и реактивной астроглии, усиление экспрессии глиального кислого фибриллярного белка, аккумуляция промежуточных филаментов в виде своеобразных тяжей и др.) [2, 3]. Основным звеном в патогенезе БА является нарушение метаболизма белка-предшественника амилоида (Аβ) и отложение его наноразмерных глобулярных и полимерных фибриллярных форм в виде амилоидных бляшек [4].

Известно, что амилоидоподобные белки $A\beta1$ -40, $A\beta1$ -42, включая прионы PrP_{27-30} , в перевиваемой культуре клеток индуцируют продукцию окислительных радикалов, усиливают перекисное окисление липидов, жирных кислот, снижают уровень потребления аминокислот, глюкозы и других экзометаболитов [5, 6]. Вызывают ли β -амилоиды структурно-модификационные преобразования в цитоплазматической мембране астроцитов остается неизученным.

Цель работы – используя ультраструктурный анализ в сочетании с атомносиловой микроскопией оценить реакцию астроцитов в ответ на введение *in vitro* патологических β -амилоидов, выделенных из ткани мозга лиц, умерших от болезни Альцгеймера.

Материалы и методы. Образцы мозга для выделения $A\beta$ -амилоидов. Анализу подвернута ткань мозга людей (n = 2), умерших с клинически подтвержденным диагнозом «болезнь Альцгеймера». Выделение патологических белков ($A\beta$ -амилоидов) проводили по методике A. Rostagno, J. Ghiso (2009) [7].

Наличие β -амилоидов (А β 40, А β 42) контролировали на сконструированных «биочипах» согласно разработанному ранее подходу [8], заключающемуся в иммобилизации на твердотельную кремниевую поверхность специфических антиамилоидных антител: А β 1-40 (44341, Invitrogen, Германия) и А β 1-42 (44346, Invitrogen, Германия).

Экспрессию патологических белковых компонентов (Аβ-амилоидов) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем Ensyme-linked Immunosorbent Assay Kit for amyloid beta peptide 1-42 (*Cloud-clone Corp.*, США) и Ensyme-linked Immunosorbent Assay Kit for amyloid beta peptide 1-40 (*Cloud-clone Corp.*, США).

Культура клеток. Использовали перевиваемую линию культуры клеток глиомы крысы С6, полученную из коллекции культур Института цитологии РАН (Санкт Петербург). Способ культивирования – монослойный. Условия культивирования – среда DMEM (Sigma, США), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, Бельгия), гентамицин (100 мкг/мл). Посевная доза — 1.5×10^5 кл/мл. При пересеве клеток использовали 0.02% трипсин и 0.02% версен (Lonsa Bioscience, США).

Изучение морфологии клеток проводили в логарифмической фазе роста после образования сплошного монослоя (3-4 дня). Анализировали клетки прижизненно с использованием инвертированного микроскопа и с помощью светового микроскопа после их фиксации охлажденным 96% этиловым спиртом (30 мин) и окрашивании гематоксилин-эозином (10-15 мин). Контролем служили интактные культуры С6 (3-4 сутки культивирования).

Внесение в опытные культуры С6 β -амилоидов осуществляли в логарифмической фазе роста добавляя 40 мкл очищенной мозговой фракции ($C_{\rm H}=0.4$ ммоль, шаг разведения — 10^{-1} и 10^{-2}). Флаконы с культурами инкубировали при 37° С в течение 48 ч, ежедневно наблюдая и отмечая целостность, плотность клеточного монослоя и морфологию клеток.

Определение продукции глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в культивируемых астроцитах опытных и контрольных групп проводили непрямым методом флуоресцирующих антител (НМФА). Использовали поликлональные кроличьи антитела к ГФКБ в рабочем разведении 1:40 (Sigma). Анализировали 200-300 клеток в 10-15 полях зрения люминесцентного микроскопа (ув. х400).

Электронная микроскопия. Для ультраструктурного анализа контрольные и опытные образцы культуры клеток обрабатывали по стандартной методике. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Ultracut E (Reichert, Австрия) и исследовали на микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при различных увеличениях x6000-40000.

Атимно-силовая микроскопия. Анализ проводили на микроскопе Nanoscope IIId MultiMode (Digital Instruments, США), оборудованном J-сканером. Использовали контактные 100-, 200-мкм кантилеверы «Nanoprobe» (Veeco, США) из Si3N4 с константами упругости 0,12 и 0,36 H/м и тейпинговые зонды из кремния с резонансной частотой \sim 315 кГц. Для морфометрического анализа оценивали параметры шероховатости поверхности (R_a , R_q) цитоплазматической мембраны и модуль ее жесткости и упругости (модуль Юнга).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводили в программе Statistica 7.0. Результаты представляли, как среднее±стандартное отклонение. Сравнение выборок производили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. *Исследование морфологии клеток*. Культура клеток глиомы крысы С6, находящаяся в логарифмической фазе роста, при обработке антителами к ГФКБ методом непрямой иммунофлуоресценции в экспериментально созданных нами условиях культивирования состояла на 91% из астроцитов. Остальные – представлены олигодендроцитоподобными (3-5%) и незрелыми («камбиальными») клетками (3-4%). Анализу подвергались астроциты, имеющие звездчатую форму с хорошо развитыми длиннолучистыми отростками.

Наблюдение за морфологическими изменениями клеток после внесения Аβ-амилоидов. Через 12 ч после внесения в культуру глиомы С6 мозговой фракции, содержащей Аβ-амилоиды (в независимости от шага разведения) в зоне роста культур наблюдалось разрежение структуры монослоя, кроме «звездчатых» астроцитов появлялись дистрофически измененные клетки с редукцией отростков, округленными цитоплазматическими телами и гипохромными ядрами.

Часть клеток приобретала вид «голых» ядер в результате разрушения цитоскелета. В то же время местами сохранялись отдельные клетки с короткими конусовидными и коротко лучистыми отростками. Это свидетельствовало об истощении адаптивного потенциала части клеток, что приводило их к трансформации и угнетению их функциональной активности.

Электронная микроскопия. Поведенный на следующем этапе ультраструктурный анализ показал, что «звездчатые» астроциты под действием β-амилоидов претерпевают сложные морфофункциональные изменения. Клеточные ядра приобретали неровные границы, образующие в отдельны случаях ядерные «карманы». Профили гранулярного эндоплазматического ретикулума теряли четкую границу, что свидетельствовало о снижении биосинтетической активности клеток.

В ряде других астроцитов выявлялись значительные изменения митохондрий, которые характеризовались разрушением и лизисом матрикса, и редукцией крист. Отдельные митохондрии представляли собой вакуоли с электронно-прозрачным содержимым, оболочка их при этом сохранялась. Полученные результаты указывали о блокировании функции энергетического обеспечения клеток.

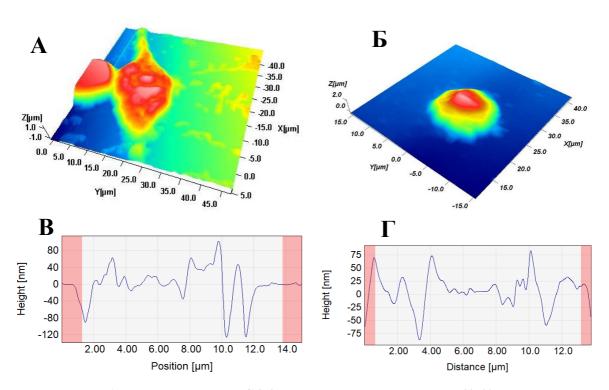
Известно, что нарушения функции митохондрий играют ключевую роль в старении клеток и их нарушении способности продуцировать $AT\Phi$ [9]. При нейродегенеративных заболеваниях, включая BA, происходит интенсификация свободно-радикальных процессов, которая является основной причиной гибели нейронов [9]. Кроме того, показано, что $A\beta$ -амилоиды могут влиять на митохондриальный геном, проникая внутрь этих органелл через мельчайшие поры мембраны [10]. При этом предполагается, что $A\beta$ -амилоиды усиливают окислительные процессы (деструкцию белков, липидов, нуклеиновых кислот, углеводов ЦНС в клетках), а также вызывают нарушение синаптической передачи между астроцитами и отростками нейрональных клеток.

Таким образом, выявленные в астроцитах ультраструктурные изменения под действием Аβ-амилоидов можно охарактеризовать как дистрофические вследствие митохондриальной дисфункции и нарушений биосинтетической активности клеток.

Атомно-силовая микроскопия. Наноскопический анализ выявил изменения в структурированности цитоархитектоники клеток после их взаимодействия с β -амилоидами. В интактных культурах микровыросты цитоплазматической мембраны достигали максимальных значений по сравнению с культурами, подвергнутыми обработке $A\beta$ -амилоидами (302,7±82 нм против 82,6±43 нм, p<0,01). В тоже время

прерывистость контуров мембраны опытных культур был более выраженной (187 ± 30 нм и 76 ± 21 нм соответственно, p<0,01).

Анализ параметров шероховатости (Ra, Rq) поверхности цитоплазматических мембран показал, что интактные клетки отличаются значительно большей среднеарифметической и среднеквадратичной шероховатостью (Ra $-655,17\pm26$ нм, Rq $-420,1\pm42$ нм, p<0,01) по сравнению с опытными культурами (Ra $-240,8\pm15$ нм, Rq $-120,6\pm14$ нм p<0,01). Таким образом, показано, что А β -амилоиды влияют на клеточную цитоплазматическую мембрану, изменяя ее структурированность и пространственную организацию (рисунок).



A — культура глиомы C6, 2 сут., контроль, размер скана 40:40 мкм; B — культура глиомы C6 (спустя 12 ч) после внесения $A\beta$ -амилоидов (шаг разведения 10^{-1}), размер скана 40:40 мкм;

B, Γ – графический микропрофиль анализа шероховатости поверхности интактных и опытных астроцитарных клеток

Рисунок – АСМ-анализ клеток линии С6 после внесения β-амилоидов

С целью получения более полной информации о структуре цитоскелета использовали силовую спектроскопию и измерение локальных значений модуля Юнга как у интактных астроцитов, так и в опытных культурах. Силовые кривые снимали в точках, расположенных вдоль выбранных линий (10 или 20 точек на линию). Показано, что на интактных астроцитах диапазон значений модуля Юнга имел большой разброс (1,4-7,8 кПа), что характерно для большинства активно-пролиферирующих эукариотических клеток. В тоже время модуль Юнга, подвергшихся трансформации Аβ-амилоидами был значительно выше (6,9-12,7 кПа). Это вероятно может указывать о том, что пучки фибрилл клеток, трансформированных β-амилоидами, более плотно прилегают к их цитоскелету, что повышает локальную жесткость этих астроглиальных клеток.

Известно, что в ткани мозга астроциты своими отростками контролируют определенный участок ткани — домен, не перекрывающийся с доменами соседних астроцитов, но при активации астроцитов и при формировании глиоза астроцитарная организация ткани меняется [1]. Обнаружено, что реактивные астроциты в зависимости от молекулярных путей, приводящих к их активации, имеют разное происхождение, морфологические признаки и профиль экспрессии специфических белков (коннексин 30, 43, паннексин 6, аквапорин 4) [1]. Аквапорины — это особые белки, входящие в состав водопроводящих каналов и активно экспрессируются в перикапиллярных ножках астроцитов и сконцентрированы на поверхностях, контактирующих с цереброспинальной жидкостью субарахноидального пространства и желудочков мозга, входящих в гематоэнцефалический барьер.

При БА нарушается целенаправленный перенос питательных веществ по атросткам астроцитов через глиальные элементы между щелевыми контактами, образованными аквапорином-4 и выведением продуктом метаболизма в периваскулярные венозные пространства. Можно предположить, что $\Lambda\beta$ -амилоиды нарушают работу транспортёров – аквапоринов, накапливаясь и патологически реактивируя астроцитарную глию.

Таким образом полученные результаты указывают о том, что под влиянием Аβ-амилоидов возрастает жесткость цитоплазматической мембраны астроцитов, изменяются параметры среднеарифметической и среднеквадратичной шероховатости микропрофилей рельефа, что сопровождается изменениями в цитоархитектонике клеток в виде увеличения количества глобулярных выступов и уменьшения разнородности кластеров на поверхности астроцитов.

Заключение. Установлено, что выделенные из ткани мозга олигомерные формы Аβ-амилоидов при внесении в культуру С6 нарушают целостность клеточного монослоя, и изменяют морфологию «звездчатых» астроцитов вследствие блокирования энергетического обеспечения и биосинтетической активности клеток. β-амилоиды вызывают структурно-модификационные преобразования в цитоплазматической мембране, что проявляется в изменении профилей микрорельефа (параметры Ra, Rq). По параметрам жесткости и упругости выявлены количественные показатели, свидетельствующие о возрастании модуля Юнга цитоплазматической мембраны трансформированных астроцитов, что указывает на прямое влияние наноразмерных патологических белковых компонентов (Аβ-амилоидов Аβ1-40, Аβ1-42) на структуру поверхностных рецепторных кластеров и характер их распределения.

Литература

- 1. О роли астроглии в головном мозге в норме и патологии / С.А. Горяйнов [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2013. № 1. С. 45–51.
- 2. Astrocytes in Alzheimer's disease / A. Verkhratsky [et al.] // J. Neurotherapeutics. 2010. Vol. 7. P. 399–412.
- 3. Involvement of astrocytes in Alzheimer's Disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective / Rodrigo E. González-Reyes [et al.] // J. Front. Mol. Neurosci. 2017. Vol. 10. P. 1–20.
- 4. Paul Murphy, M. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide / Paul Murphy M., LeVine H. // J. Alzheimers Dis. -2010. Vol. 19. P. 1-17.
- 5. β-amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: A role for oxidative stress / Brena B. [et al.] // J. Neurobiology. 2000. Vol. 7. P. 395–405.
- 6. Bosque, P. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection / P. Bosque, S. Prusiner. // J. of Virology. 2000. Vol. 74. P. 4377–4386.

- 7. Rostagno, A. Isolation and biochemical characterization of amiloid plaques and paired helical filaments / A. Rostagno, J. Ghiso // Curr. Protoc. Cell Biol. 2009. Vol. 1. P. 1–31.
- 8. Выявление белков-маркеров нейродегенерации у пациентов с когнитивными нарушениями и детекция протеазоустойчивого прионного белка (PrP27–30) при различных дементных состояниях / А. Асташонок [и др.] // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. $-2015.- \ensuremath{\mathbb{N}}\ensuremath{\mathbb{D}\ensuremath{\mathbb{D}}\ensuremath{\mathbb{D}}\ensuremath{\mathbb{D}}\ensuremath{\mathbb{D}}\ensuremath{\mathbb{D}}\ensuremath{\mathbb$
- 9. Окислительный стресс и его влияние на функциональную активность клеток при болезни Альцгеймера / Дубинина Е.Е. [и др.] // Биомедицинская химия. -2015. -№1. C. 57–69.
- 10. Calkins, M. Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons / M. Calkins, P. Hemachandra Reddy // Biochimica et Biophysica Acta. 2011. Vol. 4. P. 507–513.

AMYLOID Aβ-PEPTIDES, FORMED BY ALZHEIMER'S DISEASE, INDUCT CHANGES *IN VITRO* OF THE ASTROCYTES ARCHITECTONICS

A.N. Astashonok¹, Z.B. Kvacheva², N.N. Poleshchuk¹

¹Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology; ²Institute of Biophysics & Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Pathological protein components (β -amyloids A β 1-40, A β 1-42) were isolated from autopsy material (brain tissues) of people who died with Alzheimer's disease. A nanoscopic analysis of the culture of neuroglial cells C6 after introduction of oligomeric forms of A β -amyloids was carried out and the parameters of the astrocytes surface micro architectonics were characterized. Differences in the number of receptor clusters and the heterogeneity of distribution (Ra, Rq parameters) of the cytoskeleton, as well as in the module of rigidity and elasticity of the cytoplasmic membrane, transformed astrocytes were revealed. The obtained model makes it possible to evaluate structural-modification transformations of macroglial cells of the central nervous system under the action of various nanoscale pathological forms of A β -amyloids, and expands knowledge of dysregulatory pathological processes associated with the reactivation of astroglia in Alzheimer's disease.

Keywords. Alzheimer's disease, β -amyloids, C6 culture, nanoscopic analysis, Young's modulus, electron microscopy.

Поступила 19.11.2018

ДЕТЕКЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ОРГАНОВ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

А.Е. Гончаров^{1, 2}, О.В. Тимохина¹, А.В. Прохоров³, С.Э. Романовская^{3,4}, Л.Р. Колошко⁴

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук»; ³УО «Белорусский государственный медицинский университет»; ⁴УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер», Минск, Беларусь

Резюме. Разработан способ определения циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови пациентов со злокачественными новообразованиями брюшной полости эпителиального происхождения. Показаны высокая чувствительность и специфичность выявления отдаленных метастазов у пациентов с опухолями брюшной полости эпителиального происхождения по наличию в крови ЦОК. Показано, что, прогностически неблагоприятным в отношении эффективности лечения злокачественных новообразований поджелудочной железы является содержание ЦОК в периферической крови 1 кл/мл и более.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, рак поджелудочной железы, злокачественное новообразование, метастазы.

Введение. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) представляют собой клетки опухоли, мигрирующие посредством кровотока по всему организму, тем самым обеспечивая последующий рост метастазов в органах и тканях. Ранее было установлено, что причиной смерти от рака более чем в 90 % случаев является метастазирование [1, 2]. Гипотеза о том, что ЦОК являются предпосылкой метастазирования были впервые предложены в середине XIX века австрийским патологом Т. Эшвартом [3]. Сегодня идентификация и молекулярная характеристика ЦОК у больных раком остаются ключевыми для беспрецедентного понимания метастатического процесса. Поэтому выявление таких опухолевых клеток имеет важное прогностическое значение при раке различной локализации [4–6]. Однако процесс обнаружения ЦОК затруднен техническими проблемами, связанными в том числе с их крайне невысокой концентрацией [7]. В настоящее время существует потребность в разработке эффективного способа определения в крови пациентов с онкозаболеваниями ЦОК.

Однако даже у пациентов с метастатическим раком содержание ЦОК в крови крайне невысоко, порядка 1–3 клеток на 1 млн лейкоцитов. Соответственно, для получения достоверных результатов, требуется проведение пробоподготовки с использованием большого объема крови и учет значительного количества клеток. Важное значение имеет аккуратная пробоподготовка, максимально способствующая сохранению в образце ЦОК, идентификация и исключение из учета клеточных дуплетов и других артефактов, мертвых клеток, корректность настройки прибора и параметров учета, используемая аппаратура и программное обеспечение.

Цель данного исследования – разработка способа определения ЦОК периферической крови пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации и определение прогностической значимости детекции ЦОК.

Объекты, материалы и методы исследований. Объектами для *in vitro* исследований служили 19 образцов периферической крови (ПК) пациентов с раком поджелудочной

железы (РПЖ), 24 образца ПК пациентов с опухолями эпителиального происхождения на разных стадиях болезни (15 – с отдаленными метастазами, 9 – без отдаленных метастазов), находящихся на лечении в УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер», 9 образцов ПК здоровых добровольцев.

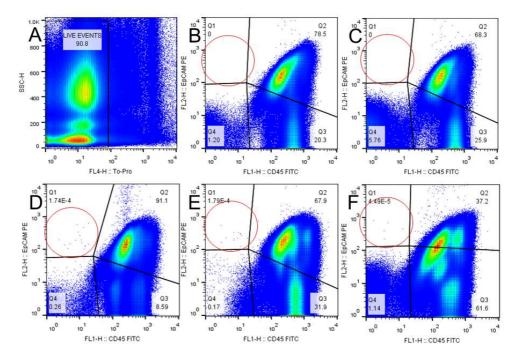
В работе использовали следующие реагенты: фосфатный буферный раствор, лизирующий раствор, моноклональные антитела к CD326, CD45, краситель To-Pro3.

Содержание ЦОК определяли методом проточной цитометрии. Инкубировали в 5-ти пробирках объемом 15 мл по 1 мл исследуемой периферической крови с лизирующим раствором на протяжении 10 минут при 18–25 °C для лизиса эритроцитов. Для осаждения клеток центрифугировали пробирки 10 мин при 1500 об/мин, аккуратно удаляли супернатант пипеткой. Отмывали клетки от лизирующего раствора раствором DPBS, центрифугируя пробирки 10 минут при 1500 об/мин, удаляли супернатант пипеткой. Клетки инкубировали в 1 пробирке с антителами к молекулам CD326 (PE), CD45 (FITC) и интеркалирующим красителем То-Pro3 на протяжении 20 мин при 4–8 °C. Отмывали суспензию от несвязавшихся антител DPBS, центрифугируя пробирку 10 мин при 1500 об/мин, удаляли супернатант. Клетки суспендировали в 3–5 мл раствора DPBS и учитывали на цитометре.

В процессе анализа ЦОК выполняли последовательное гейтирование одиночных клеток, жизнеспособных клеток, построение цитограммы в координатах CD45\CD326, выделение региона CD326 $^{\rm hi}$ CD45 $^{\rm -}$ событий (ЦОК). Рассчитывали процентное содержание ЦОК среди всех жизнеспособных ядросодержащих клеток периферической крови и количество ЦОК на 1 мл крови.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica версии 12 (StatSoft, CIIIA) и MedCalc версии 4.8. Значения показателей представлены в виде Ме (25–75), где Ме – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро-Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Для поиска предикторов эффективности был применен логистический регрессионный анализ. Для всех изучаемых факторов вычисляли коэффициент логистической регрессии, стандартную ошибку коэффициента, отношение рисков (ОР), 95 % доверительные интервалы (ДИ) и статистическую значимость (р). Для определения диагностической ценности показателей был использован метод ROC-анализа с расчетом площади под рабочей характеристической кривой (AUROC). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости р <0,05.

Результаты исследований. Для выявления ЦОК использовали маркер EpCAM (CD326) — адгезивная молекула, которая экспрессируется на поверхности большинства злокачественных клеток эпителиального происхождения. Лейкоциты и другие клетки гемопомэтического происхождения исключали определением на поверхности молекулы CD45. В качестве интеркалирующего красителя для идентификации мертвых клеток применяли To-Pro3 (рисунок).



А – гейтирование жизнеспособных То-Pro3⁻клеток; В – донор № 5; С – донор № 6; D – пациент с метастатическим раком легкого (контроль); E – пациент с РПЖ-03К; F – пациент с РПЖ (группа сравнения)

Рисунок – Идентификация ЦОК методом проточной цитометрии

Учет одной пробы на цитометре BD FACSCalibur занимает до 60 мин (при скорости учета 3000–6000 кл/сек). Данные записывали в несколько файлов по 1×10^6 клеток на файл с последующим объединением файлов в один при помощи программы FCS Concatenator. Для анализа данных применяли различные программы, такие как BD FACDiva (версия 7), Weasel (версия 3.3), Kaluza (версия 1.5), FlowJo (версия 10.0.7). В наших экспериментах, наилучшие результаты для быстрого и точного анализа большого числа данных показала программа FlowJo.

У здоровых добровольцев ЦОК выявлены не были. У пациентов с опухолями эпителиального происхождения и отдаленными метастазами (n = 15) их содержание составило от >0 до 187 кл/мл крови или 0,000193 (0,00004-0,00032) % от числа всех ядросодержащих клеток периферической крови. У 3 из 9 пациентов с опухолями эпителиального происхождения без отдаленных метастазов выявлены ЦОК в количестве до 0,0004 %. У 9 из 19 пациентов с РПЖ, включенных в основную группу исследования, установлено присутствие ЦОК в периферической крови. Содержание колебалось от >0 до 5 кл/мл или 0,000094 (0,000024-0,00028) % от числа всех ядросодержащих клеток периферической крови.

Методом ROC-анализа установлена чувствительность и специфичность выявления отдаленных метастазов у пациентов с опухолями эпителиального происхождения, в том числе РПЖ, по наличию в крови ЦОК (таблица 1). Определена точка диагностически значимого уровня (cut-offpoint) – величина, используемая для разделения ряда значений на две части.

Таблица 1. – Результаты ROC-анализа

Показатель			Чувствительность, %	Специфичность, %
ЦОК (абс. значения, кл/мл)	$0,840 \pm 0,06$	>0	83,3	80,0
ЦОК (относит. значения, %)	$0,882 \pm 0,06$	>0	88,9	85,0

Для поиска предикторов эффективности лечения был применен логистический регрессионный анализ. Вычисляли коэффициент логистической регрессии, стандартную ошибку коэффициента, отношение рисков, 95 % доверительные интервалы и статистическую значимость (таблица 2).

Таблица 2. – Результаты моновариантного логистического регрессионного анализа

Показатель	OP	95 % ДИ	p
ЦОК (абс. значения, кл/мл)	0,34	0,13-0,92	0,027
ЦОК (относит. значения, %)	0,33	0,13-0,87	0,021

Анализ результатов исследования показал, что отсутствие ЦОК является предиктором эффективности лечения РПЖ.

В соответствии с полученными нами данными, прогностически неблагоприятным в отношении эффективности лечения злокачественных новообразований поджелудочной железы является содержание ЦОК в периферической крови 1 кл/мл и более. Прогностически благоприятным в отношении эффективности лечения злокачественных новообразований поджелудочной железы и отсутствия отдаленных метастазов является отсутствие ЦОК в периферической крови или их содержание менее 1 кл/мл.

Заключение. Показано, что чувствительность и специфичность выявления отдаленных метастазов у пациентов с опухолями эпителиального происхождения, в том числе РПЖ, по наличию в крови ЦОК составляет 83,3 % и 80,0 % соответственно. Показано, что, прогностически неблагоприятным в отношении эффективности лечения злокачественных новообразований поджелудочной железы является содержание ЦОК в периферической крови 1 кл/мл и более. Разработанный метод изложен в инструкции по применению «Метод прогнозирования эффективности лечения злокачественных новообразований поджелудочной железы» (рег. № 073-0618, утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 22.06.2018 г.).

Литература

- 1. Wittekind, C. Cancer invasion and metastasis / C. Wittekind, M. Neid // Oncology. -2005. Vol. 69, suppl. 1. P. 14-16.
- 2. Weiss, L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s / L. Weiss // Cancer Metastasis Rev. 2000. Vol. 19, No. 3-4, chap. I–XI. P. 193-383.

- 3. Ashworth, T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death / T. Ashworth // Austral. Med. J. 1869. Vol. 14. P. 146-149.
- 4. Gemcitabine inhibits the micrometastasis of non-small cell lung cancer by targeting the EpCAM-positive circulating tumor cells via the HGF/cMET pathway / Z.J. Liao [et al.] // Int. J. Oncol. 2014. Vol. 45, No. 2. P. 651-658.
- 5. Detection and isolation of circulating tumor cells: Principles and methods / H. Esmaeilsabzali [et al.] // Biotechnol. Adv. 2013. Vol. 31, No. 7. P. 1063-1084.
- 6. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations [Electronic resource] / G. Barriere [et al.] // Ann. Transl. Med. 2014. Vol. 2, No. 11. Mode of access: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04. Date of access: 01.11.2018.
- 7. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes / M.G. Krebs [et al.] // Ther. Adv. Med. Oncol. 2010. Vol. 2, No. 6. P. 351-365.

METHOD FOR DETERMINING OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CANCER OF DIFFERENT LOCALIZATION

A.Y. Hancharou^{1,2}, O.V. Timohina¹, A.V. Prokhorov³, S.E. Romanovskaya^{3,4}, L.R. Kaloshka⁴

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology;

²Institute of Biophysics & Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus;

³Belarusian State Medical University;

⁴Minsk City Clinical Oncologic Dispensary, Minsk, Belarus

A method was developed for determination of the circulating tumor cells (CTC) in the peripheral blood of patients with epithelial cancer of the organs of the abdominal cavity. High sensitivity and specificity of the detection of distant metastasis using CTC determination was shown. CTC value more than 1 cell/ml of blood has been shown as prognostically adverse regarding the efficacy of the cancer treatment efficacy.

Key words: circulating tumor cells, pancreatic cancer, malignancy, metastasis.

Поступила 19.11.2018

ВЛИЯНИЕ ГРИБОВ РОДА *GANODERMA*, *LENTINULA*, *BOLETUS* НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА

$E.В. Дуж^1, A.Е. Гончаров^{1,2}$

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

Резюме. Показано, что исследованные экстракты грибов класса базидиомицетов родов *Ganoderma*, *Lentinula*, *Boletus* обладают широким спектром иммуномодулирующей активности. Было показано, что *Boletus edulis* в сравнимой степени усиливает экспрессию поверхностных маркеров на перевиваемых лимфоидных линиях клеток Jurkat-tat и Daudi, а также увеличивает продукцию свободных радикалов кислорода дендритными клетками, моноцитами и нейтрофилами периферической крови.

Ключевые слова: Ganoderma lucidum, Lentinula edodes, Boletus edulis, иммунные клетки, проточная цитометрия.

Введение. Применение человеком базидиальных грибов в лечебных целях восходит еще к доисторическим временам. До наших дней сохранились традиции использования лекарственных свойств грибов таких как *Ganoderma lucidum* (Рейши) и *Lentinula edodes* (Шиитаке) в народной медицине стран Юго-Восточной Азии [1, 2].

К настоящему моменту собран значительный материал о составе и биологическом действии экстрактов грибов, которые содержат различные биологически активные вещества, такие как полисахариды, гликопротеины, терпены, стеролы, пигменты и др. [3].

На сегодняшний день в информационных базах имеется большое количество научных публикаций и патентов, которые посвящены исследованию лечебных свойств *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes* и о роли их применения в медицине [4]. Проведенные исследования за последние десятилетия как в Республике Беларусь, так и за рубежом продемонстрировали, что базидиомицеты имеют определенный потенциал в фармакологии, ввиду наличия иммуномодулирующих, противоопухолевых, антибактериальных, противовирусных и других свойств [5].

Несмотря на повышенный интерес к грибам рейши и шиитаке в отношении иммуномодулирующих свойств, перспективными для изучения с последующим применением в биологии и медицине могут быть и другие грибы, в том числе, типичные для Восточно-Европейского региона. Так, *Boletus edulis* (белый гриб, боровик), относится к семейству Болетовых (лат. *Boletaceae*) — распространенный гриб в Республике Беларусь [6].

По некоторым полученным ранее литературным данным известно, что в состав гриба *B. edulis* входят вещества, которые обладают большим лечебным потенциалом, спектр активности которых имеет достаточно широкое применение, но в то же время, несмотря на ряд публикаций, мало известно об иммуномодулирующей активности данного вида гриба на клетки иммунитет человека [7].

Целью настоящего исследования являлось сравнительное исследование иммуномодулирующего действия грибов родов *Ganoderma*, *Lentinula*, *Boletus* по отношению к клеткам системы иммунитета.

Материал и методы. Объектом исследования явились грибы отдела базидиомицетов: *Ganoderma Lucidum, Lentinula Edodes* и *Boletus edulis*. В работе использовали перевиваемые линии клеток: Т-лимфоцитарную клеточную линию человека

Jurkat-tat (человек, Т-лимфобластный лейкоз) и В-лимфоцитарную клеточную линию Daudi (человек, лимфома Беркитта), а также – периферическую кровь доноров (n = 9).

Приготовление суспензии водного экстракта грибов. Грибы высушивали до постоянного веса при 40°С, измельчали в бытовой кофемолке. Для приготовления водного экстракта взвешивали 200 мг сухого гриба, добавляли 4 мл бидистиллированной воды. Раствор выдерживали 30 мин при комнатной температуре, затем нагревали суспензию на водяной бане 10 мин при 90°С. После этого полученный экстракт (50 мкг/мл) центрифугировали для осаждения нерастворенных веществ и фильтровали через 0,22 мкм фильтр.

Культивирование перевиваемых клеточных линий. Клеточные культуры Daudi и Jurkat-tat выращивали на питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% термоинактивированную телячью эмбриональную сыворотку, L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина и пируват натрия.

Получение дендритных клеток (ДК). Мононуклеарные клетки (МПК) выделяли на градиенте плотности фиколл-пака из образцов периферической крови доноров. Моноциты выделяли из фракции МПК методом адгезии и культивировали в питательной среде RPMI-1640 с 10% телячьей эмбриональной сывороткой с добавлением комбинации цитокинов 100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и интерферона-альфа при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% C02, что позволило нам получить фенотипически дифференцированные ДК из моноцитов крови в течение 4-х суток [8].

Инкубация клеток с исследуемыми экстрактами грибов. Исследования проводили в 3-5-кратных повторах. Взвесь культуры ДК, гепаринизированную цельную кровь разливали по лункам 6-луночного планшета. Планшеты с клетками инкубировали при 37° С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. ДК сокультивировали с исследуемыми водными экстрактами грибов на протяжении 24 час, T-клетки -6 час, а нейтрофилы и моноциты периферической крови -30 мин.

Определение поверхностных молекул. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием моноклональных флуоресцентно меченных антител [9].

Определение продукции свободных радикалов кислорода клетками периферической крови. Детекцию реактивных форм кислорода (reactive oxygen species – ROS) осуществляли с использованием дигидрородамина (DHR123) [10].

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ «Statistica» (версия 10–12 «StatSoft», США) и «StatPlus» 4.9 («AnalystSoft», США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-го и 75-го процентилей. Для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости р <0,05 Статистическая обработка данных выполнена с применением непараметрических методов статистики (критерий Шапиро-Вилка, Манна-Уитни). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости р<0,05 [11].

Результаты и их обсуждение. Влияние грибов на продукцию свободных радикалов кислорода дендритными клетками, моноцитами и нейтрофилами периферической крови. Мы проанализировали влияние водных экстрактов рейши, шиитаке и белого гриба на

продукцию ROS ДК, нейтрофилами и моноцитами периферической крови с использованием зонда DHR123.

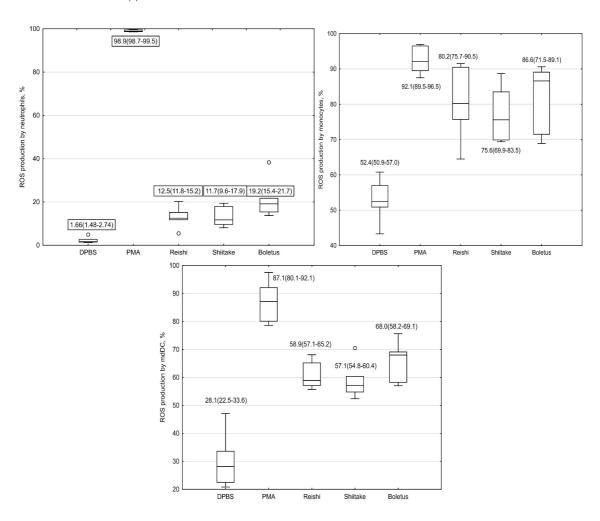


Рисунок 1. – Влияние водных экстрактов рейши, шиитаке и боровика на продукцию ROS нейтрофилами, моноцитами и ДК периферической крови

Все три полученные водные фракции грибов вызывали увеличение продукции ROS ДК, моноцитами и нейтрофилами. Было показано, что число клеток, продуцирующих свободные радикалы кислорода, было больше по сравнению с отрицательным контролем. Наибольшая стимулирующая активность проявлялась в положительном контроле. Полученные результаты не различались достоверно между экстрактами разных грибов (р<0,05), но имели достоверные различия с отрицательными и положительными контролями.

Изучение влияния водных экстрактов грибов на дендритные клетки. Оценивали экспрессию CD205, CD206 и HLA-DR на функцию ДК. В таблице 1 представлены результаты оценки экспрессии данных маркеров.

Результаты определения молекулы CD205 на поверхности ДК показали, что положительный контроль и все изучаемые нами виды водных экстрактов грибов вызывали активацию клеток (p<0,05).

Таблица 1. – Показатели экспрессии молекул CD205, CD 206, HLA-DR дендритными клетками при сокультивировании с водными экстрактами грибов

Вещество	CD205, %	CD206, %	HLA-DR, %
ОК	44,35(35,7-66,6)	81,4(76,45-85,3)	93,25(88,35-97,9)
ПК	54,85(34,55-80,25)	89(85-94,25)	95,4 (92,3-98,25)
Экстракт Boletus edulis	53,5(41,05-55,4)	77,5(68,2-82,3)	92,55(86,9-94,95)
Экстракт Ganoderma lucidum	55,5(52,55-59,75)	75,35(69,1-86)	87,05(75-96,8)
Экстракт Lentinula edodes	52,7(38,95-62,6)	82,75(76,65-88,9)	91,25(84,3-98,25)

Как показано в таблице 1, экспрессия молекулы CD206 и HLA-DR не изменилась достоверно при сокультивировании ДК с положительным контролем и исследуемыми грибами.

*Изучение влияния водных экстрактов грибов на г*летки линии Jurkat-tat. Клетки линии Jurkat-tat сокультивировали с растворами грибов на протяжении 6 час. В качестве положительного контроля использовали ФМА. Для определения активации Т-клеток использовали определение классического маркера CD69 и молекулу HLA-DR (таблица 2).

Таблица 2. – Экспрессия молекул CD80, HLA-DR клетками линии Jurkat-tat при сокультивировании с водными экстрактами грибов

Вещество	CD69, %	HLA-DR, %
ОК	11,5 (10,1-13,7)	24,1 (18,05-30,2)
ПК	64,2 (51,5-83,8)	25,7 (21,35-27,3)
Экстракт Boletus edulis	27,8 (22,05-50,6)	29,55 (25,35-34,9)
Экстракт Ganoderma lucidum	35,0 5(27,45-40,05)	27,15 (20,5-32,75)
Экстракт Lentinula edodes	15,95 (14,2-23,25)	26,8 (22,85-32,6)

В эксперименте было показано, что все исследованные водорастворимые экстракты грибов усиливают экспрессию молекулы CD69 на линии клеток Jurkat-tat по сравнению с отрицательным контролем (p<0,02). Экспрессия HLA-DR не изменялась достоверно.

Изучение влияния водных экстрактов грибов на B-клетках. Результаты определения экспрессии молекулы CD86 и HLA-DR представлены в таблице 3. CD86 в данном исследовании характеризуются усилением экспрессии по сравнению с отрицательным контролем, который составил 5,4 (4,1-6,7) %. Экспрессия CD86 Boletus edulis (p=0,012) на B-лимфоцитах почти в два раза превысила показатели положительного контроля (20,5 (21,5-24,8) %).

Таблица 3. – Экспрессия молекул CD86, HLA-DR Т-клетками при сокультивировании с грибами

Название гриба	CD86, %	HLA-DR, %
ОК	5,4 (4,1-6,7)	92,4 (91,9–93,9)
ПК	20,5 (21,5-24,8)	93,4 (92,0–94,0)
Boletus edulis	38,6 (35,05-42,6)	92,5 (92,1–96,1)
Ganoderma lucidum	24,6 (23,45-30,05)	93,4 (92,6–94,2)
Lentinula edodes	16,5 (14,2-20,25)	96,4 (93,0–97,4)

Заключение. Исследование показало, что водные фракции всех исследованных нами грибов вызывали увеличение продукции ROS нейтрофилами, моноцитами и ДК, оказывали иммуномодулирующее действие на функции клеток иммунитета. Каждый из экстрактов грибов продуцировал ROS, уровень которых был, по крайней мере, на 20% больше, чем в отрицательном контроле. Эффект грибов родов *Ganoderma, Lentinula, Boletus* проявлялся в усилении экспрессии CD205 ДК, повышении экспрессии CD69 Тлимфоцитами и CD86 В-лимфоцитами, что свидетельствует об иммунобиологической активности исследуемых нами базидиомицетов.

Было установлено, что водные экстракты гриба *Boletus edulis* обладают сравнимой иммуномодулирующей активностью с грибами рейши и шиитаке.

Таким образом, результаты наших исследований убедительно доказывают возможность применения экстрактов *Boletus edulis* и биологически-активных соединений, извлеченных из него, в перспективе в качестве нового природного иммуномодулятора.

Литература

- 1. Макаренко, А.Н. Противоопухолевое действие веществ, полученных из высших грибов *Cordyceps sinensis* и *Ganoderma lucidum* в экспериментах *in vitro* и *in vivo* / А.Н. Макаренко, М.П. Рудик, Р.С. Довгий // Вісник проблем біології і медицини. 2013. Т. 2, Вип. 3. С. 30-35.
- 2. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs)S / S. Bastiaan-Net [et al.] // Int. Immunopharmacol. 2013. Vol. 15. P. 167-175.
- 3. Отбор продуцентов противоопухолевых соединений среди базидиальных грибов / Т.В. Теплякова [и др.] // Медицинские науки. -2011. № 3. С. 217-223.
- 4. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems / S.P. Wasser [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. -2010.-Vol. 12, No. 1. -P. 1-16.
- 5. Пучкова, Т.А. Перспективы использования новых штаммов лекарственных макромицетов для создания функциональных продуктов питания / Т.А. Пучкова, Т.В. Черноок // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. ст. Минск: Ин-т микробиол. НАН Беларуси. 2011. T. 3. C. 284-302.
- 6. Characterization of a water-soluble polysaccharide from Boletus edulis and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice / D. Wang [et al.] // Carbohydrate Polymers. -2014. Vol. 105. P. 127-134.
- 7. Вассер, С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы / С.П. Вассер // Биосфера. 2015. № 2. С. 238-248.
- 8. Оптимизация метода получения дендритных клеток из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга для иммунотерапии пациентов с туберкулезом / А.Е. Гончаров [и др.] // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 4. С. 94-102.

9. Дуж, Е.В. Сравнительный профиль экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул Т-лимфоцитарных клеточных линий человека / Е.В. Дуж, А.Е. Гончаров // Новости мед.-биол. наук. -2018. - № 1. - С. 126-134.

10.Взаимодействие лактобацилл и их компонентов с нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами периферической крови человека / Л.П. Титов [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. -2013. № 3. - С. 19-27.

11.A guide to modern statistical analysis of immunological data [Electronic resource] / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. – 2007. – Vol. 8. – P. 27. – Mode of access: http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27. – Date of access: 22.05.2014.

EFFECT OF MUSHROOMS OF THE kind GANODERMA, LENTINULA, BOLETUS ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE IMMUNITY SYSTEM CELLS

E.V. Duzh¹, A.Y. Hancharou^{1,2}

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology; ²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

It was shown that the extracts of the *Ganoderma*, *Lentinula*, and *Boletus* mushrooms possess a wide spectrum of immunomodulatory activity. It was demonstrated that Boletus edulis elevates the expression of surface markers on lymphoid cell lines Jurkat and Daudi, and also increases the expression of reactive oxygen species by dendritic cells, monocytes and peripheral blood neutrophils.

Keywords: Ganoderma lucidum, Lentinula edodes, Boletus edulis, immune cells, flow cytometry.

Поступила 21.11.2018

РАСШИРЕННАЯ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА В-ЛИМФОЦИТАРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Дуж¹, А.Е. Гончаров^{1,2}

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Резюме. Проведен расширенный анализ экспрессии поверхностных маркеров гемопоэтических клеточных линий В-лимфоцитарного происхождения с целью выбора наиболее подходящей клеточной линии для скрининга и тестирования веществ с иммуномодулирующими свойствами. В результате исследования отобрана линия клеток Daudi, экспрессирующая наиболее полный набор маркеров активации.

Ключевые слова: В-лимфоцит, линия клеток, иммунофенотип, культура клеток.

Введение. В настоящий период времени в Республике Беларусь и странах СНГ фармацевтическими компаниями активно ведутся разработки новых лекарственных средств с иммуномодулирующими свойствами [1]. Одной из основной и необходимой стадии исследования новых лекарственных средств с иммуномодулирующим действием на доклиническом этапе является оценка их биологической активности [2]. В настоящее время существует множество различных общепринятых, но уже устаревших методов исследований биологической активности иммуномодуляторов как in vitro, так и in vivo, а в частности, использование экспериментальных животных или первичные культуры клеток крови человека [3]. Такой подход к исследованию не дает достоверной информации о том, как исследуемые лекарственные средства будут влиять на организм человека, за счет различных в фармакокинетических характеристиках человека и животных [4]. В связи с этим, большой интерес представляют перевиваемые клеточные линии человека, которые способны отвечать на различные стимулы изменением экспрессии поверхностных молекул [5]. Применение гемопоэтических клеточных линий позволит исключить использование лабораторных животных, даст возможность стандартизовать метолы значительно повысить их повторяемость И воспроизводимость, что, в конечном счете, приведет к уменьшению расходов на тестирование существующих и поиск новых лекарственных средств.

Все это позволяет рассматривать В-клеточные линии в качестве одной из моделей для тестирования иммуномодулирующих лекарственных средств.

Цель: изучить расширенный иммунофенотип перевиваемых В-клеточных линий с целью обоснования их дальнейшего применения в тестировании иммуномодулирующих лекарственных средств.

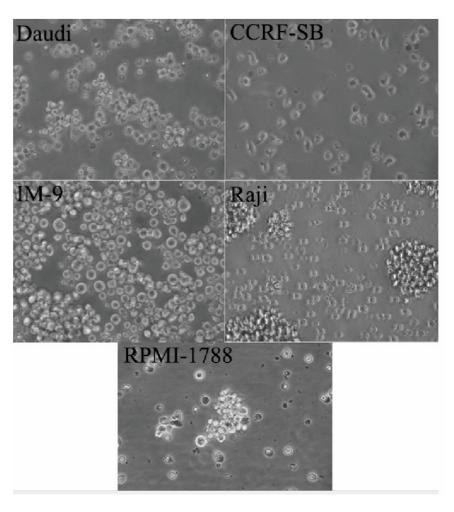
Материал и методы. Объекты исследований. В качестве объектов *in vitro* исследований были использованы 5 перевиваемых В-лимфоцитарных клеточных линий: Daudi (человек, лимфома Беркитта), IM-9 (человек, миелома), Raji (человек, лимфома Беркитта), RPMI-1788 (человек, лейкоциты периферической крови здорового донора) и CCRF-SB (человек, острый лимфобластный лейкоз).

Все клеточные линии по характеру роста являются суспензионными культурами. Клетки выращивали на питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (FCS), L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина, пируват натрия. Клетки выращивали в стерильных пластиковых вентилируемых флаконах для суспензионных культур с площадью поверхности 12,5 см², 25 см² и 75 см² в СО2-инкубаторе при 37°С с содержанием 5% углекислого газа и относительной влажности 90%.

Определение поверхностных молекул. Иммунофенотип линий клеток определяли методом проточной цитометрии. Иммунофенотипический анализ с клеточными линиями был проведен в 3-5 повторах. Для исследований были использованы моноклональные антитела к следующим антигенам человека: CD5, CD10, CD15, CD19, CD23, CD27, CD40, CD45, CD54, CD62L, CD69, CD79a, CD80, CD86, HLA-DR, HLA-ABC, kappa-lambda-цепи. Клетки инкубировали с моноклональными антителами 15 мин при +4°C в темноте. Несвязавшиеся антитела отмывали путем центрифугирования в фосфатном буферном растворе. Удаляли супернатант, затем клетки ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буферного раствора и учитывали на проточном цитометре.

Статистическая обработка данных выполнена с применением непараметрических методов статистики (критерий Шапиро-Вилка, Манна-Уитни). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости p<0,05.

Результаты и их обсуждение. Микрофотографии исследованных линий клеток представлены на рисунке 1.



увеличение 200×, фазовый контраст **Рисунок 1. – Микрофотографии** линий **В-клеток**

Несмотря на довольно широкое применение В-клеточных культур в различных *in vitro* исследованиях, профиль экспрессии поверхностных маркеров описан недостаточно.

Все В-клеточные перевиваемые линии были исследованы и охарактеризованы на предмет экспрессии поверхностных антигенов. Для оценки иммунофенотипа была

проанализирована экспрессия ряда мембранных маркеров, наиболее важных для определения стадий дифференцировки В-клеток и оценки функционального потенциала. Данные относительной интенсивности экспрессии молекул представлены в таблице и рисунке 2.

Таблица – Сравнительная экспрессия поверхностных антигенов В-клеточных перевиваемых линий (показаны медианные значения)

Молекула	Daudi	CCRF-SB	IM-9	Raji	RPMI 1788			
		Маркеры В-л	имфонитов					
CD23	1,1	1,0	54,3	1,9	4,0			
CD45	236,2	118,2	111,4	120,4	85,7			
Молекула	Daudi	CCRF-SB	IM-9	Raji	RPMI 1788			
	Π	 Гопуляционные ма	аркеры В-клето)K				
CD10	70,3	1,4	1,3	22,8	1,6			
CD19	14,9	2,5	4,6	15,4	7,4			
CD79a	72,3	10,7	34,2	307,6	20,3			
kappa	32,5	1,04	12,4	2,4	1,7			
lambda	2	1,7	2,3	1,7	32,1			
Молекула	Daudi	CCRF-SB	IM-9	Raji	RPMI 1788			
L		Молекулы ГКС	I и II класса					
HLA-DR	1524,6	155,0	3523,1	4,4	6,4			
HLA-ABC	1,7	157,1	309,1	102,7	438,6			
				•				
Молекула	Daudi	CCRF-SB	IM-9	Raji	RPMI 1788			
	Костиму	ляторные и кони	нгибиторные м	олекулы				
CD27	69,6	2,7	1,6	17,4	1,2			
CD40	205,7	55,7	274,6	332,0	253,0			
CD80	38,9	12,1	131,8	49,1	146,3			
CD86	93,9	11,6	113,1	33,2	270,0			
	-							
Молекула	Daudi	CCRF-SB	IM-9	Raji	RPMI 1788			
		Молекулы	алгезии	1				
CD15	1,8	1,8	17,7	1,0	4,0			
CD54	288,7	17,0	210,2	268,5	260,0			
-	- 7 ·	7 -	- 7		1 7-			
Молекула	Daudi	CCRF-SB	IM-9	Raji	RPMI 1788			
	Разн	ц — — — — — — — — — — — — — — — — — — —	ые группы мол	іекул				
CD5	1,1	136,2	1,2	1,1	1,1			
CD62L	20,6	26,6	3,4	6,1	50,2			
CD69	124,3	19,5	27,1	28,2	10,3			

		global			I
Dandi	CCRF-SB	6-MI	Raji	3523,09 WI-1788	_name_
1	98,3	1	1	1,2	CD5
100	7	1,7	1	1,4	CD10
6,9	29	24,1	2,5	12,3	CD15
97,8	8,4	72,8	97,5	47,7	CD19
1	1	99,3	5,7	16,3	CD23
98,2	22,8	3	95,1	1,3	CD27
100	18	100	100	100	CD40
100	100	99,3	100	96,8	CD45
100	70,5	99,6	100	95,3	CD54
88,2	98,5	30,3	50,2	74,7	CD62L
66,6	97	9,8	98,1	49,1	CD69
94,6	98,4	92,7	100	51,6	CD79a
100	12,7	100	100	98,7	CD80
100	11,2	98,5	79,5	98,7	CD86
7,3	100	100	100	100	HLA-ABC
100	46,3	100	63,8	46,8	HLA-DR
7,3	1	80	16,1	25,8	kappa
17,5	21,6	12,3	4,2	88,3	lambda

Рисунок 2. – Теплокарта, иллюстрирующая сравнительную экспрессию поверхностных антигенов линиями клеток (представлен процент экспрессии молекул клетками)

Установлено, что все пять линий клеток вне зависимости от степени дифференцировки экспрессировали молекулы CD45 (общий маркер клеток гемопоэтического происхождения) и HLA-ABC, что указывает на их происхождение и видовую специфичность (человек).

Клеточная линия Daudi. Линия клеток Daudi представляет собой Влимфобластидную линию, полученую в мае 1967 г. Э. Клейном и Г. Клейном из крови 16-летнего пациента, страдающего лимфомой Беркитта. В клетках Daudi отсутствует клеточная экспрессия молекул HLA класса I, несмотря на наличие внутриклеточных тяжелых цепей I класса. Они имеют дефект в гене кодируя 02-микроглобулин (02 м), что

приводит к отсутствию трансляционной мРНК для этого белка. Клетки Daudi продуцируют поверхностные иммуноглобулины, вирус Эпштейна-Барра и капсидный антиген (VCA). Перевиваемые В-лимфоциты имеют высокую чувствительность к IFN-а.

Клеточная линия широко используется в изучении механизмов острых лейкозов, а также в вирусологии, благодаря возможности использовать эти клетки для репликации ВЭБ [6].

Оценка иммунофенотипа исследуемой культуры Daudi показала, что большая часть клеток высоко экспрессирует типичные B-клеточные маркеры: CD10, CD19, CD27, CD40, CD69, CD79a, CD80, CD86, HLA-DR, карра-цепь иммуноглобулинов, что указывает на достаточную фенотипическую зрелость данной линии. Следует отметить, что лишь небольшое число клеток в культуре (~30%) экспрессировали ГКС I класса, в то время как, экспрессия HLA-DR составила 1524,6 усл. Ед.

Также следует отметить, что Daudi имеет высокую экспрессию маркера адгезии, а именно CD54 (ICAM-1) с высоким уровнем показателем интенсивности (RFI –288,7 усл. Ед.). Молекула CD62L (L-селектин) присутствовала в значительном количестве на культуре (RFI – 20,6 усл. Ед.).

Клеточная линия ССRF-SB. Опухолевая суспензионная культура ССRF-SB была получена из периферической крови 11-летнего мальчика с острым лимфобластным лейкозом. Клетки ССRF-SB чувствительны к ВЭБ.

Главным отличием от всех изучаемых нами линий является то, что CCRF-SB не экспрессирует поверхностных иммуноглобулинов. CCRF-SB имеет большую область изучения в иммунологических и вирусологических исследованиях [7].

Принадлежность культуры CCRF-SB к В-лимфоцитарной линии была подтверждена экспрессией целым рядом мембранных молекул. К таким молекулам, прежде всего, относятся CD10, CD19, CD27 (маркер памяти В-клеток), CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, HLA-ABC, HLA-DR.

Лишь на линии клеток CCRF-SB наблюдалась максимальная экспрессия CD5 – субпопуляционного маркера В-клеток (RFI – 136,2 усл. Ед.).

На клеточной линии CCRF-SB костимуляторные молекулы CD27, CD40, CD80 и CD86 представлены в широком диапазоне (RFI от 2,7 до 55,7 усл. Ед.).

Выявлена невысокий уровень экспрессии CD79 а (RFI - 10,7 усл. Ед.), в то время как у других популяционных маркеров она не выявлялась. Среди всех исследуемых нами молекул адгезии, наиболее ярко выражена экспрессия у CD54 (RFI - 17 усл. Ед.).

Клеточная линия IM-9. Линия клеток IM-9 представляет собой линию лимфобластоидов, трансформированную вирусом Эпштейна-Бар, которая была получена в 1967 г. из периферической крови женщины с множественной миеломой.

Клетки характеризуются высокой продукцией IgG, что связано с дифференцировкой их в В-клетки памяти, а также имеют рецепторы для инсулина, кальцитонина и человеческого гормона роста [8].

Культура IM-9 характеризуется наличием экспрессии следующих поверхностных маркеров: CD19, CD20, CD79a, kappa-цепь, HLA-DR. Культура IM-9 экспрессирует следующие характерные для нее мембранные молекулы: CD10, CD19, CD23, CD27, CD40, CD45, CD54, CD79a, CD80, CD86, а также CD69 и HLA-DR, что указывает на наличие высокодифференцированных клеток в культуре. Костимуляторные молекулы CD40, CD80 и CD86, которые присутствуют на всех клеточных линиях, характеризовались достаточно высокой экспрессией на представленной линии. Молекула HLA-DR характеризуется самой высокой экспрессией из всех представленных линий (RFI – 3523,1 усл. Ед.). Выявлена слабая экспрессия CD19 (RFI – 4,6 усл. Ед.), но при этом другие маркеры, указывающие принадлежность культуры к Влимфоцитарному происхождению CD79a (RFI – 34,2 усл. Ед.) и легкая цепь lambda (RFI

-12,4 усл. Ед.), а также маркер CD23 (RFI -54,3 усл. Ед.) присутствуют в значительном количестве. Представленные в таблице молекулы адгезии имеют различный диапазон интенсивности экспрессии (RFI от 1,9 до 210 усл. Ед.).

Клеточная линия Raji. Гемопоэтическая клеточная линия Raji была получена в 1963 г. из недифференцированных лимфобластоидных клеток 11-летнего пациента, страдающего Лимфомой Беркитта. Raji синтезируют иммуноглобулины IgM, клетки чувствительны к ретровирусу обезьяны.

Raji, необычны тем, что они несут несколько копий генома EBV в своей ДНК. По этой причине они представляют собой полезную модельную систему для изучения рецептора инсулина в трансформированных EBV лимфоцитах.

Raji также используются для обнаружения иммунного комплекса, поскольку клетки экспрессируют несколько рецепторов для определенных компонентов комплемента, а также рецепторы Fc для иммуноглобулина G [9].

Клетки Raji экспрессируют на поверхности своей мембраны такие В-клеточные антигены как: CD10, CD19, CD27, CD40, CD45, CD54, CD69, CD79a, CD80, CD86, HLA-ABC.

Установлена максимальная экспрессия CD79a (RFI – 307,6 усл. Ед.) среди всех культур. Также наблюдается положительная экспрессия и у всех других популяционных маркеров CD10, CD19. Слабая экспрессия наблюдалась на легких цепях Ig.

Следует отметить присутствие высокой экспрессии среди всех костимуляторных молекул CD40 (RFI - 32,1 усл. ед.), другие представленные молекулы отмечаются более низким уровнем экспрессии (CD27 (RFI - 17,4 усл. Ед.), CD80 (RFI - 49,1 усл. Ед.) и CD86 (RFI - 33,2 усл. Ед.)) по сравнению с CD 40.

При изучении молекул адгезии было выявлено разная интенсивность экспрессии флюоресценции. Наиболее высокая экспрессия наблюдалась у CD54 (RFI – 268,5 усл. Ед.)

Клеточная линия RPMI-1788. Перевиваемая культура клеток была получена в 1968 г. из лейкоцитов периферической крови здорового 33-летнего донора, иммортализованых ВЭБ. От других В-клеточных линий ее отличает то, что клетки при культивировании образуют большие кластеры.

Линия RPMI 1788 гетерогенна и является продуцентом преимущественно гексамерной формы IgM [10].

Как видно из представленных данных, клетки экспрессируют молекулы CD15, CD19, CD23, CD40, CD45, CD54, CD62L, CD69, CD79a, CD80, CD86, HLA-ABC и HLA-DR. Экспрессия молекул CD5, CD10, CD27 на клетках отсутствует.

Следует отметить, что RPMI-1788 характеризуется высокой экспрессией костимуляторных молекул CD40, CD80, CD86, при этом наблюдается более высокая экспрессия адгезивных молекул CD43, CD54. Популяционный маркер CD79а характеризуется достаточно высокой экспрессией (RFI – 20,3 усл. Ед.) в сравнении с другими молекулами – CD10 и CD19. Отсутствует и экспрессия молекулы CD27. Экспрессия легкой цепи Ig lambda в умеренном количестве присутствовала только на линии RPMI-1788 (RFI – 32,1 усл. Ед.)

Заключение. После проведенных исследований из всех культур нами выбрана наиболее подходящая для изучения иммуномодулирующей активности лекарственных средств клеточная линия — Daudi, экспрессирующая наиболее полный набор молекул наиболее важных для определения стадий дифференцировки В-клеток и оценки функционального потенциала.

Литература

- 1. Данченко, Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур / Е.О. Данченко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. -2012. -№ 2. C. 22-31.
- 2. Дуж, Е.В. Моноцитарные дендритные клетки как in vitro модель для тестирования иммуномодуляторов / Е.В. Дуж, А.Е. Гончаров // Новости мед.-биол. наук. -2016. -№ 2. -C. 108-116.
- 3. Иммуномодуляторы бактериальной природы, зарегистрированные в Российской Федерации / Т. И. Немировская [и др.] // Биопрепараты. 2014. № 3. С. 19-25.
- 4. Руководство по проведению доклинических исследований / А.Н. Миронов [и др.]; под общ. ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- 5. Daudi (ATCC® CRL-213TM) [Electronic resource]. Mode of access: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-213.aspx. Date of access: 26.11.2014.
- 6. Fadeel, B. Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line / B. Fadeel // Leukemia. 2005. Vol. 19, No. 1. P. 159-161.
- 7. IM-9 [CCRF SB] (ATCC® CCL-120TM) [Electronic resource] // ATCC. Mode of access: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-120.aspx. Date of access: 10.11.2014.
- 8. Isolation of human Fab antibodies specific for the low-affinity IgE receptor (CD23) by selecting a hierarchical antibody library system against B lymphoblastic IM-9 cells / H. Choi [et al.] // Immunol. Lett. 2011. Vol. 136. P. 213-220.
- 9. Marx, V. Models: stretching the skills of cell lines and mice / V. Marx // Nat. Meth. 2014. Vol. 11. P. 617-620.
- 10. RPMI 1788 (ATCC® CCL-156 TM) [Electronic resource] // ATCC. Mode of access: http://http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-156.aspx. Date of access: 17.11.2015.

EXTENDED IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTIC OF HUMAN B-LYMPHOCYTE CELL LINES

A.V. Duzh¹, A.Y. Hancharou^{1,2}

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology; ²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

An extended analysis of expression of surface molecules in human hematopoietic B-cell lines was conducted. The most suitable B-lymphoid line was determined for screening and testing of substances with immunomodulatory properties. The data obtained showed that the cell line Daudi expressed the most comprehensive set of surface markers to assess the immunobiological properties of drugs. This line was selected for future studies.

Keywords: cell line, B-lymphocyte, immunophenotype, immunomodulatory drugs.

Поступила 10.11.2018

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО ГЕРПЕСА У ВЗРОСЛЫХ

О.А. Романива

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

Резюме. Анализ особенностей течения рецидивирующего герпеса у 79 взрослых пациентов показал, что частые обострения наблюдались преимущественно у лиц до 40 лет с сопутствующими инфекционно-воспалительными заболеваниями респираторного и/или урогенитального трактов и наличием дисбиоза кишечника. Противовирусная терапия при рецидивах инфекции зачастую была недостаточно эффективной, что указывает на целесообразность добавления к лечению иммунокорректоров. Наибольшая клиническая эффективность иммунокоррекции с использованием ГМДП (ликопида) была достигнута у пациентов с тяжелыми обострениями перманентно протекающего герпеса, при внегенитальных проявлениях инфекции и анамнезом заболевания более 2-х лет.

Ключевые слова: рецидивирующий герпес, клинические особенности, иммунокоррекция.

Введение. Проблема герпесвирусных инфекций не теряет своей актуальности, несмотря на многочисленные исследования различных аспектов патогенеза заболевания, подходов к лечению и профилактики обострений. До сих пор продолжает увеличиваться число лиц, страдающих рецидивирующей герпесвирусной инфекцией (РГИ) различной локализации, вызванной вирусами простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типа [1]. Возбудитель РГИ обладает способностью проникать в самые различные клетки организма человека: лимфоциты, в клетки кожных покровов и слизистых оболочек дыхательного, желудочнокишечного и урогенитального трактов, печени, центральной и периферической нервной системы, эндотелия сосудов. Инфицирование возможно как одним, так и двумя типами возбудителя. У взрослых высыпания чаще локализуются в аногенитальной и лабиальной области. У людей с адекватным ответом системы иммунитета репликация ВПГ находится под иммунологическим контролем, в результате чего обострения герпесвирусной инфекции возникают редко или вообще не появляются в течение всей жизни. Нарушения иммунной защиты могут происходить в результате воздействия различных экзогенных и эндогенных факторов, что приводит к ослаблению контроля над размножением патогена, и в результате к возникновению обострения. Рецидив герпесвирусной инфекции могут спровоцировать другие инфекционные заболевания, переохлаждение, чрезмерная инсоляция, психические или физические стрессы, различные интоксикации, циклические изменения гормонального статуса (менструации), особенно при дисбалансе уровня гормонов у женщин, резкая смена климатических поясов и др. При тяжелом течении рецидивирующего герпеса возможно одновременное появление очагов поражения на нескольких участках тела (например, в аногенитальной области, на губах, на коже носогубного треугольника), зачастую последовательно (одно обострение на фоне другого), что может приводить к затяжному течению рецидива. Высыпания способны сопровождаться ощущением жжения, боли, жара, напряжения и/или зуда кожи. При тяжелом течении рецидивирующего герпеса возможно ухудшение физического и психического состояния больных, проявляющиеся слабостью, лихорадкой, ознобом, миалгией, артралгией, цефалгией, нарушением сна, эмоциональной лабильностью. Помимо этого у большинства лиц с тяжелым течением ВПГ-инфекции характерно наличие хронических инфекционно-воспалительных заболеваний различной локализации, со смешанным характером микрофлоры и зачастую ее устойчивостью к повторным курсам антибиотикотерапии, что можно расценивать как множественные маркеры вторичного

иммунодефицита. Как правило, в таком состоянии пациенты меняют лечебные учреждений в поисках адекватной помощи, но в ряде случаев эпизодические курсы противовирусной и общеукрепляющий терапии не дают значимого клинического эффекта. Учитывая важнейшую роль иммунной системы в контроле репликации и диссеминации вируса, с целью предупреждения манифестирования герпетической инфекции широко используются иммунотропные средства различного действия [2]. Однако, даже при использовании современных иммунокорректоров, в 15-50% случаев добиться выраженной и стойкой эффективности не удается [3]. Одной из причин этого является эмпирическое назначение иммунотропных средств, без учета клинических и иммунологических особенностей пациента. В связи c ЭТИМ дальнейшая разработка иммунопрофилактики рецидивов герпесвирусной инфекции не теряет своей актуальности.

Цель работы – проанализировать особенности течения рецидивирующего герпеса и оценить их влияние на клиническую эффективность иммунокорригирующей терапии.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 79 пациентов в возрасте от 18 до 55 лет с часто рецидивирующей герпетической инфекцией (6 и более обострений ежегодно), у которых не было предлеченности иммунотропными средствами в течение последних двух лет, использования системных глюкокортикостероидов, наличия беременности/кормления грудью и соматической патологии в стадии декомпенсации. Диагноз ставился на основании жалоб, объективного осмотра, лабораторных методов исследования. Верификация диагноза герпесвирусной инфекции проводилась по наличию специфических анти-ВПГ-IgG-антител против вируса герпеса 1 и 2 типов в сыворотке крови, как показателя наличия хронического процесса, обусловленного ВПГ, а также с помощью выделения вирусной ДНК методом полимеразной цепной реакции в соскобах из пузырьков при обострении заболевания. Пациенты с РГИ находились в отделении иммунопатологии и аллергологии ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», где кроме иммунокорригирующей терапии проводилось исключение первичных иммунодефицитов, выявление причин вторичной иммунологической недостаточности и коррекция коморбидной патологии. Иммунокоррекция проводилась однократно в период ремиссии герпесвирусной инфекции в виде монотерапии глюкозаминилмурамилдипептидом (ГМДП, торговое название «Ликопид», ЗОА «Пептек», Россия; № ЛС – 001438 от 24.03.2006). Схема использования: 2,5 мг (¼ таблетки по 10 мг) сублингвально натощак за 30 мин до еды через день № 12 общим курсом 24 дня с общей курсовой дозой 30 мг. Пациенты наблюдались в течение года после окончания курса применения ГМДП, в случаях возникновения обострений герпеса за этот период для купирования рецидива использовались потивовирусные средства из группы ациклических нуклеозидов (ацикловир, валацикловир) в режиме эпизодического приема по стандартной схеме. Клиническую эффективность иммунотерапии оценивали по четырем общепринятым клиническим показателям: снижение частоты рецидивов в 1,5 и более раза, уменьшение продолжительности и тяжести обострений, удлинение межрецидивного периода в 2 и более раза [4].

Статистический анализ данных проводился с помощью программы STATISTICA (версия 6.0) и SPSS-13.0. При оценке полученных данных использовались описательная и непараметрические методы вариационной статистики (критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона), критерий χ^2 и Фишера в таблицах сопряженности 2×2 . Значимыми считали различия при p<0,05. Числовые значения представлены в виде медианы (Ме) и интерквартильного размаха (25%; 75%).

Результаты исследования и обсуждение. Для учета и анализа клинических признаков заболевания, а также для полноценной оценки эффекта лечения на первом этапе была использована клинико-иммунологическая карта пациента с РГИ. В данную

карту включены сведения об основных особенностях заболевания (длительность процесса, локализация сыпи, тип течения инфекции, провоцирующие обострение сопутствующие заболевания, использование противовирусных иммунотропных средств в прошлом и на момент наблюдения), а также учтены клинические признаки, динамика которых позволяет объективно результативность иммунокоррекции (частота, длительность и тяжесть обострений, продолжительность межрецидивного периода). Опрос и осмотр пациентов проводились при первом обращении к врачу, а также во все периоды динамического наблюдения (через 3, 6, 12 месяцев после завершения иммунокорригирующей терапии). Заполнение карты осуществлялось лично пациентом с участием лечащего врача. Последующая обработка результатов позволила провести как полномасштабную характеристику обследованной интегральную группы пациентов, так оценку эффекта иммунокорригирующей терапии по комплексу клинических проявлений. Тяжесть рецидивов РГИ оценивалась по шкале, представленной в таблице 1 [5].

Таблица 1. – Шкала оценки тяжести обострений у пациентов с РГИ

Симптом	Степень выр	Степень выраженности симптомов, расчетные единицы				
Симптом	1	2	3			
Боль, зуд, жжение в области	мало	умеренно	сильно			
высыпаний	выраженные	выраженные	выраженные			
Общее недомогание	нет	имеется	выраженное			
Наличие пузырьков, язв,	единичные	небольшое кол-во	множественные			
трещин						
Эритема и отечность	мало	умеренно	сильно			
	выраженные	выраженные	выраженные			
Общая площадь высыпаний	до 2 см ²	от 2 до 5 см ²	более 5 см ²			
Повышение температуры тела	норма	до 37.2	более 37.2			
Увеличение регионарных ЛУ	нет	единичные	множественные			
Парестезии	нет	умеренно	сильно			
		выраженные	выраженные			

Клиническое состояние пациента в момент рецидива герпесвирусной инфекции определялось по субъективным ощущениям (боль, зуд, жжение в местах высыпаний и выраженность парестезий) с использованием визуальной аналоговой шкалы (ВАШ; в англоязычной литературе - Visual Analog Scale, VAS). Шкала представляет собой вариант десятисантиметровой линейки, на которой пациент произвольно, не видя делений, в любом ее месте от 0 до 10 включительно, после краткого инструктажа со стороны врача, отмечает «место» своего самочувствия и/или субъективной выраженности конкретного симптома. Самооценка состояния на отметке 0-3 соответствовала отсутствию или мало выраженной степени субъективных ощущений обострения герпеса (присваивался 1 балл согласно таблице оценки тяжести проявлений рецидива), отметка 3-7 – умеренно выраженные ощущения (2 балла), отметка 7-10 – сильно выраженные (3 балла). Оценка субъективной окраски обострения РГИ проводилась при каждом посещении пациента в установленные сроки. Объективно при осмотре пациентов с рецидивом заболевания исследователем при дневном свете на отечно-гиперемированной коже в типичных местах определялись везикулы размером 2-3 мм, с серозным содержимым. Количество элементов варьировало от единичных до десятка. Нередко одновременно имелись элементы сыпи на разных стадиях развития – везикулы, пустулы, болезненные гиперемированные или покрытые желто-коричневыми корочками эрозии. При подсчете количества элементов сыпи (папул, пузырьков, эрозий) проводилась балльная оценка: 1-2 элемента – 1 балл, 3-4 элемента – 2 балла, 5 и более –

3 балла. Площадь высыпаний определялась как произведение длины и ширины условного прямоугольника, включающего высыпания. Стороны прямоугольника измерялись с помощью десятисантиметровой линейки. Если сыпь занимала площадь до $2 \text{ см}^{\frac{1}{2}}$ – присваивался 1 балл, от 2 до $\frac{1}{2} \text{ см}^2$ – 2 балла, более $\frac{1}{2} \text{ см}^2$ – 3 балла. Степень выраженности гиперемии и/или отечности оценивалась исследователем: 1 балл - с трудом определяемая (мало выраженная), 2 балла – легко обнаруживаемая при обычном дневном свете гиперемия и/или отечность кожи в местах высыпаний (умеренно выраженные), 3 балла – явное покраснение кожи и/или отек мягких тканей в зонах появления сыпи (сильно выраженные). Температура тела пациента измерялась в присутствии врача с помощью максимального медицинского термометра в подмышечной области в течение 10 мин. При температуре тела до 37,0°C присваивался 1 балл, до 37,2°C – 2 балла, выше 37,2°C – 3 балла. Пальпация лимфатических узлов проводилась в помещении при комнатной температуре в положении стоя (шейная и подмышечная группа узлов) и лежа на кушетке (паховые лимфатические узлы). Если лимфатические узлы не определялись присваивался 1 балл, при пальпации 1-2 узлов одной группы – 2 балла, при обнаружении 3 и более узлов одной локализации или 2 и более узлов разных групп – 3 балла. Затем все баллы суммировались. При сумме баллов менее 9 обострение расценивалось как невыраженное, течение рецидивирующего герпеса как нетяжелое, в связи с чем пациенты после анкетирования при первичном визите не включались в исследование.

Окончательный состав группы исследуемых лиц в зависимости от клинических особенностей течения РГИ суммирован в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, в окончательном виде сформированная группа включала 14 мужчин (18%) и 65 женщин (82%) в возрасте от 19 до 55 лет (средний возраст наблюдаемых составил 33,9±8,8 лет) с длительностью заболевания от года до 30 лет (5,0 (2,0; 10,0)). Средний возраст женщин – 33,1±8,7 лет, мужчин – 33,1±9,6 лет. Среди пациентов преобладали люди молодого возраста (до 40 лет), доля которых составила 73% в группе мужчин и 79% в группе женщин. Из 79 пациентов 56 (71%) страдали герпетической инфекцией внегенитальной локализации (лабиальный, назальный герпес, герпес кожи щек, подбородка, век), 16 человек (20%) – герпесвирусной инфекцией аногенитальной области, 7 обследуемых (9%) – сочетанием первых двух форм. Средний внегенитальным пациентов c герпесом составил генитальным/сочетанным герпесом - 35,5±8,5 лет. Среди мужчин внегенитальная локализация высыпаний наблюдалась в 64% случаев (у 9 человек из 14), а среди женщин в 72% (у 47 наблюдаемых из 65). У пациентов обострения возникали с частотой 10,0 (7,0; 12,0) рецидивов в год. У основной массы больных (60%, 47 человек) обострения герпеса возникали от 6 до 12 раз в год, а у 40% пациентов (32 человека) инфекция носила постоянно рецидивирующий характер (≥12 ежегодных рецидива). Обострения длились 7,0 (5,0; 10,0) дней. Анализ анамнестических данных также показал, что у значительной части пациентов наблюдалось затяжное течение обострений герпеса: у 52 человек из 79 (66%) рецидивы длились неделю и более, из них у 3 наблюдаемых – более 20 дней. Меньший удельный вес среди обследованных составляли лица, у которых обратная эволюция клинических проявлений герпеса проходила в течение 3-6 дней – 27 человек (34%). Оценка тяжести проявлений рецидивов составила 12,5 (13,0; 16,0) расчетных единиц, причем у 55 пациентов из 79 (70%) обострения протекали с яркой клинической картиной (13 и более расчетные единицы). В 86% случаев герпесвирусная инфекция протекала ациклично (у 68 больных из 79), в 14% носила монотонный характер (у 11 обследуемых из 79).

Возникновение обострений заболевания 68 человек из 79 (86%) связывали с действием провоцирующих факторов, среди которых наиболее часто указывалось

переохлаждение (у 51 пациентов из 79, в 65% случаев), реже психоэмоциональные перегрузки (у 37 человек из 79, 47%), обострение сопутствующих воспалительных заболеваний (у 24 пациентов из 79, 31%), mensis (у 14 женщин из 65, 21%), перегревание (у 16 человек из 79, 20%). При этом провоцирующими рецидивы факторами у пациентов с внегенитальным герпесом преимущественно являлись переохлаждение (у 43 человек из 56 (77%) против 10 человек из 23 (43%) при генитальном/сочетанном герпесе, χ^2 =8,19, p=0,004) и возникновение интеркуррентных воспалительно-инфекционных заболеваний (у 23 человек из 56 (41%) против 3 пациентов из 23 (13%) при генитальной/сочетанной локализации, p=0,01 с поправкой Фишера). На взаимосвязь обострений с психоэмоциональными перегрузками, перегреванием (гиперинсоляцией), менструальным циклом наблюдаемые с экстрагенитальным и генитальным/сочетанным герпесом указывали одинаково часто.

Таблица 2. – Клиническая характеристика пациентов с РГИ (n=79)

	Признак	
Длительность заболевания		5,0 (2,0; 10,0)
Средний возраст		33,9±8,8 лет
Пол	мужчины	14 пациентов (18%)
	женщины	65 пациентов (82%)
Локализация	внегенитальная	56 пациентов (71%)
	генитальная	16 пациентов (20%)
	сочетанная	7 пациентов (9%)
Частота обострений	количество ежегодных рецидивов	10,0 (7,0; 12,0)
-	до 12 раз в год	47 пациентов (60%)
	≥12 раз в год	32 пациента (40%)
Длительность обострений	всего дней	7,0 (5,0; 10,0)
-	затяжное течение обострений	52 пациента(66%)
	течение обострений до недели	27 пациентов (34%)
Тяжесть обострений	расчетные единицы	12,5 (13,0; 16,0)
_	тяжелое обострение (13-24 расчетных	55 пациентов (70%)
	единиц)	
	умеренно тяжелое обострение	24 пациента (30%)
	(9-12 расчетных единиц)	
Тип течения инфекции	ацикличный	68 пациентов (86%)
	монотонный	11 пациентов (14%)
Наличие факторов,	всего	68 пациентов (86%)
провоцирующих	переохлаждение	51 пациент (65%)
обострения	психо-эмоциональные перегрузки	37 пациентов (47%)
	обострение интеркуррентных заболеваний	24 пациента (31%)
	mensis	14 женщин (21%)
	перегревание	16 пациентов (20%)
Сопутствующие	хронические инфекционно-воспалительные	45 пациентов (57%)
заболевания	заболевания	
	респираторного/урогенитального тракта	
	патология ЖКТ	20 пациентов (25%)
	гнойные инфекции кожи	8 пациентов (10%)
	аллергопатология	8 пациентов (10%)
	дисбиоз кишечника	36 пациентов из 50 (72%)
Системное использование а	ациклических нуклеозидов при обострении в	65 пациентов (82%)
прошлом		
Иммунокоррекция за 2 года	а до включения в исследование	22 пациента (28%)

Рядом авторов подчеркивается, что у пациентов с тяжелым течением рецидивирующей герпетической инфекции часто выявляются другие клинические

маркеры иммунологической недостаточности в виде хронических воспалительных заболеваний различной локализации [6]. В исследуемой группе наиболее часто встречались хронические инфекционно-воспалительные заболевания респираторного тракта (фарингит, тонзиллит, трахеит, риносинусит, бронхит) и/или урогенитальной системы (цистит, пиелонефрит, аднексит, простатит) — в 57% случаев (у 45 человек из 79). Среди указанных лиц 24 пациента (30% от всех обследованных) имели поражения респираторного тракта, 15 человек (19%) — урогенитального тракта, 9 пациентов (11%) — сочетанную локализацию. Патология желудочно-кишечного тракта в анамнезе отмечалась у 25% пациентов (20 человек). С одинаковой частотой у пациентов с герпесом в анамнезе встречались гнойные инфекции (фурункулы, акне, пиодермия) и аллергопатология (аллергический ринит, дерматит) — в 10% случаев (по 8 человек).

Учитывая важное значение нормальной микробиоты кишечника в обеспечении системы, работы иммунной был проведен анализ результатов микробиологических исследований отделяемого толстого кишечника у 50 пациентов с рецидивирующей герпетической инфекцией. При этом дисбиоз кишечника, подтвержденный в нескольких исследованиях, был выявлен у 36 пациентов (72%). Наиболее часто выявлялся дефицит нормобиоты в сочетании с повышенным ростом условно-патогенной флоры (УП Φ) – у 19 из 36 пациентов с дисбиозом (53%). Дисбиоз с нарушением нормобиоты обнаружен у 19 человек (39%). Следует отметить, что только у 19 пациентов (53%) с лабораторно подтвержденным дисбиозом имелись клинические признаки нарушения кишечного микробиоценоза (дискомфорт или боли по ходу кишечника, вздутие живота, нарушения стула), у 9 пациентов (25%) наблюдалась сопутствующая хроническая патология желудочно-кишечного тракта.

Анализ используемых ранее лекарственных средств показал, что 65 человек из 79 (в 82% случаев) применяли ациклические нуклеозиды в эпизодическом режиме при обострении герпеса. При этом 30 больных из 65, использовавших противовирусные средства (46%), отмечали их низкую эффективность в купировании рецидива, что дополнительно указывает на необходимость добавления в схемы иммунокорректоров. 22 (28%)У пашиентов был опыт использования иммунокорректоров как минимум за два года до начала наблюдения (интерфероны («Генферон», «Виферон»), индукторы интерферона («Циклоферон», «Кагоцел»), противогерпетическая вакцина без существенного изменения характера течения заболевания. Известно, что эффективность иммунотропных препаратов зачастую зависит от своевременности их назначения с учетом клинических особенностей, этапов развития, стадии заболевания [7]. Поэтому была проанализирована зависимость долгосрочного эффекта иммунокорригирующей терапии ГМДП от исходных клинических проявлений заболевания. Для этого через 12 месяцев после окончания иммунокоррекции катамнестически выделили 2 группы пациентов – с положительным клиническим эффектом (n = 63, I группа) и отсутствием такового (n = 16, II группа). Клиническую эффективность оценивали по клиническим признакам, описанным выше. Состав групп пациентов с эффективной и неэффективной иммунокоррекцией суммирован в таблице 3. Как видно из таблицы 3 между группами с эффективной иммунокоррекцией и с отсутствием эффекта статистически значимых различий по полу, возрасту, давности герпетической инфекции, локализации высыпаний, длительности обострений, продолжительности межрецидивного периода, типу течения инфекции, сопутствующих воспалительных заболеваний урогенитального респираторного тракта не выявлено. В то же время у пациентов с эффективной иммунокоррекцией в сравнении с пациентами с нерезультативной терапией сыпь чаще была более обильной (p=0,003 с поправкой Фишера), сопровождалась парестезиями (p=0,019 с поправкой Фишера) и носила постоянно рецидивирующий характер (p=0,041 с поправкой Фишера).

Таблица 3. – Сравнительная клиническая характеристика пациентов с эффективной и неэффективной иммунокоррекцией ГМДП через 12 месяцев (n = 79)

Сведения по	Эффект ИКТ (n=63)	Отсутствие эффекта ИКТ (n=16)		
Длительность заболевания, лет	5,0 (2,0;10,0)	5,0 (2,0;10,0)		
Средний возраст, лет			33,7±9,5	31,5±5,8
По-	муж.		10 (16%)	4 (25%)
Пол	жен.		53 (84%)	12 (75%)
	внегенитальн	ая	45 пациентов	11 пациентов
П			(71%)	(69%)
Локализация	генитальная/с	сочетанная	18 пациентов	5 пациента
			(29%)	(31%)
	количество е	жемесячных	0,8	0,8
	рецидивов		(0,6;1,0)	(0,7;0,9)
H	до 12 раз в го	ду	34 пациента	13 пациентов
Частота обострений, в месяц		•	(54%)	(81%)*
	≥12 раз в год	≥12 раз в году		3 пациента
			(46%)	(19%)*
Межрецидивный период, дни	•		36,5 (30,4;52,1)	36,5 (33,2;45,6)
	всего дней		7,0 (7,0;10,0)	7,0 (5,0;10,0)
п	затяжное течение		42 пациента	10 пациентов
Длительность обострений,	обострения		(67%)	(62%)
дни	течение обострения до		21 пациентов	6 пациента
	недели		(37%)	(38%)
	баллы		14,0 (13,0;16,0)	13,0 (10,0;15,0)
		<5 элементов	25 человек (40%)	13 человек (81%)*
	сыпь	≥5 элементов	38 человек (60%)	3 человека
Выраженность обострений				(19%)*
r		нет	31 человек	13 человек
			(49%)	(81%)*
	парестезии	есть	32 человек (51%)	3 пациента (19%)*
	ацикличный	•	55 пациентов	13пациентов
T			(87%)	(81%)
Тип течения инфекции	монотонный		8 пациентов	3 пациента
				(19%)
Хронические инфекционно-	имеются		33 человек	12 человек
воспалительные заболевания			(52%)	(75%)
респираторного/урогенитальн	нет		30 человек	4 человека
ого тракта			(48%)	(25%)

Примечания: *п — различия значимы в сравнении с аналогичными параметрами у пациентов с эффективной иммунокоррекцией, р<0,05 (частотный анализ с использованием четырехпольной таблицы с применением поправки Фишера)

Помимо индивидуального анализа эффективности иммунотропной терапии, через 12 месяцев после иммунокоррекции была также оценена динамика клинических показателей, характеризующих эффективность иммунокоррекции (частота и тяжесть обострений, длительность межрецидивного периода) в целом у пациентов, сгруппированных по одному из клинических признаков. При этом сравниваемые группы не различались по клиническим особенностям течения заболевания, за исключением критерия разделения. Результаты анализа представлены в таблице 4.

Таблица 4. — Отдаленный результат иммунокоррекции ГМДП в зависимости от клинических особенностей РГИ (n = 79)

Клиниче	eckne	До	о иммунокорр	екции	Через 12 месяцев после иммунокоррекции		
критерии		частота обостре- ний, в месяц	межреци- дивный период, дни	тяжесть обострений, расч. ед	частота обостре- ний, в месяц	межреци- дивный период, дни	тяжесть обострений, расч. ед
Давность заболева- ния	≤2-х лет n=25 >2-х лет n=54	0,8 (0,6;1,0) 0,8 (0,6;1,0)	35,5 (30,4;48,9) 36,5 (30,4;52,1)	15,0 (13,0;15,5) 14,0 (13,0;16,0)	0,7 (0,4;1,1) 0,4 (0,3;0,7)	47,7 (29,1;86,4) 74,7 (41,9;122,0)*	11,0 (9,0;13,5) * 11,5 (9,0;14,0) *
Локали- зация	внеге- ниталь ная n=56 генит./ сочета н n=23	0,7 (0,5;1,0) 0,9 (0,8;1,0)	43,1 (30,4;60,8) 33,5 (30,4;36,5)	14,0 (13,0;16,0) 13,0 (13,0;15,5)	0,4 (0,3;0,5) * 0,8 (0,6; 1,1)	79,3 (61,0;122,0) * 39,4 (27,7;54,9)	10,5 (9,0;13,0) * 12,5 (10,5;14,5)

Примечание: * – различия значимы в каждой из групп до и после иммунокорригирующей терапии

Из таблицы 4 видно, что у пациентов с внегенитальной локализацией инфекции иммунокоррекция дала более значительный отдаленный эффект (уменьшилась частота и тяжести обострений, p<0,001, увеличился межрецидивный период, p=0,031), в то время как при генитальном и сочетанном герпесе существенной динамики ни по одному клиническому признаку не наблюдалось. При сопоставлении пациентов с различной давностью заболевания выявлен более значимый результат при длительности анамнеза 2 года и более (уменьшилась частота и тяжесть обострений, p<0,001). У лиц с анамнезом герпесвирусной инфекции менее 2-х лет уменьшились только тяжесть рецидивов (p=0,003).

Заключение. Таким образом, герпесом с частым рецидивированием преимущественно страдали лица до 40 лет (73-79%), за медицинской помощью главным образом обращались женщины (82%), что согласуется с данными литературы [8]. У большей части наблюдаемых пациентов обострения инициировались провоцирующими факторами (в 86% случаев), а также помимо РГИ имелись другие клинические маркеры иммунологической недостаточности в виде хронических воспалительных заболеваний различной локализации (57%) и/или дисбиоза кишечной микрофлоры (72%). Использование противовирусных средств (применяли 82% обследованных в режиме эпизодической терапии) не решало проблемы рецидивирования герпеса, что дополнительно указывает на необходимость добавления в схемы иммунокорректоров. Достижение положительного эффекта ГМДП и его выраженность зависели от особенностей патологического процесса. Так, эффективность ГМДП чаще наблюдалась у пациентов с постоянно рецидивирующим течением герпеса (р=0,041 с поправкой Фишера) и более тяжелым проявлением обострений в виде наличия обильной сыпи (≥5 элементов р=0,003 с поправкой Фишера), сопровождавшейся парестезий (р=0,019 с поправкой Фишера). Выраженность эффекта в виде положительной динамики

максимального количества признаков, характеризующих клинический эффект, наблюдалась в группе пациентов с внегенитальным герпесом (уменьшение частоты и тяжести обострений, p<0,001, удлинение межрецидивного периода, p=0,031) и длительностью заболевания с частым рецидивированием более 2-х лет (уменьшение частоты и тяжести рецидивов, p<0,001; удлинение межрецидивный периода, p=0,024). Выявление наиболее информативных признаков эффективности терапии может иметь значение для прогноза результативности иммунокоррекции.

Литература

- 1. 2017 European guidelines for the management of genital herpes / R. Patel [et al.] // Int. J. STD & AIDS. 2017. Vol. 28, No. 14. P. 1366-1379. doi: 10.1177/0956462417727194.
- 2. Абрамова, Т.В. Новые возможности терапии генитального герпеса / Т.В. Абрамова, И.Б. Мерцалова // Terra Medica. 2012. № 1. С. 26-32.
- 3. Шабалин, А.Р. Влияние комплексной терапии на показатели иммунного статуса и клинику урогенитального герпеса / А.Р. Шабалин, Е.А. Шатохина, А.И. Конопля // Вестник дерматологии и венерологии. -2004. -№ 2 C. 48-50.
- 4. Исаков, В.А. Иммунопатогенез герпеса / В.А. Исаков, С.Б. Рыбалкин, М.Г. Романцов // Герпетическая инфекция: рекомендации для врачей / В.А. Исаков, С.Б. Рыбалкин, М.Г. Романцов. СПб., 2006. С. 11-31.
- 5. Шперлинг, Н.В. Клинико-иммунологические особенности и рациональная терапия рецидивирующего генитального герпеса / Н.В. Шперлинг, А.В. Шаропина // Российский журнал кожных и венерических болезней. Приложение «Герпес» 2008. № 2. С. 23-26.
- 6. Герпетическая инфекция тяжелого течения / Н.А. Дидковский [и др.] // Терапевтический архив. -2007. -№ 11. -ℂ. 52-57.
- 7. Лебедев, К.А. Иммунная недостаточность (выявление и лечение) / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина. М.: Медицинская книга, 2003. С. 348-372.
- 8. Smith, J.S. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review / J.S. Smith, N.J. Robinson // J. Infect. Dis. 2002. Vol. 186. P. 3-28.

CLINICAL FEATURES AND IMMUNOTHERAPY OF RECURRENT HERPES IN ADULTS

O.A. Romaniva

Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

Analysis of the specificity of recurrent herpes in 79 patients showed, that aggravation has often occurred in patients under 40 years old that had concurrent respiratory or urogenital infections or both, along with intestinal dysbiosis. Antiviral therapy in recurrence wasn't effective enough, which indicates the desirability of adding immunotherapy. It's been achieved higher efficacy in therapy of patients having severe extragenital herpes for more than two years by administrating Glucoseminyl muramildipeptide (Licopid).

Keywords: recurrent herpes, clinical features, immunocorrection.

Поступила 16.11.2018

ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА НА АНТИБИОТИКИ ИЗ ГРУПП БЕТА-ЛАКТАМОВ И ФТОРХИНОЛОНОВ

И.В. Романова^{1,2}, А.Е. Гончаров^{1,2}, Е.И. Чалей³

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; ²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»; ³УЗ «2-я центральная районная поликлиника Фрунзенского района г. Минска», Минск, Беларусь

Резюме. В исследование было включено 26 пациентов, в анамнезе которых наблюдались реакции гиперчувствительности немедленного типа на антибиотики из групп бета-лактамов и фторхинолонов. Постановку теста активации базофилов осуществляли с использованием маркера дегрануляции CD63 и маркера активации CD203c. Установлено, что чувствительность выявления лекарственной аллергии по показателю $\rm UA^{63}$ составляет 76,9%, а специфичность – 90,0%; по показателю $\rm UA^{203c}$ – 69,2% и 90,0% соответственно.

Ключевые слова: тест активации базофилов, гиперчувствительность, антибиотики.

Введение. Широкое использование антибактериальных средств закономерно влечет за собой увеличение количества побочных реакций, в том числе реакций лекарственной гиперчувствительности. [1]. Бета-лактамная группа антибиотиков представляет собой первую линию эмпирического лечения для большинства инфекционных заболеваний [1]. При этом в общей популяции около 10% имеют указание на «аллергию на пенициллины» в анамнезе [2]. Однако, известно, что 90% пациентов, у которых такой диагноз установлен лишь на основании анамнеза, истинная аллергия не подтверждается в том числе кожными и провокационными пробами [3]. Стратегия снятия диагноза «аллергии на бета-лактамные антибиотики» в настоящее время является приоритетной и направлена прежде всего на уменьшение использования антибиотиков из групп резерва, учитывая принципы рациональной антибиотикотерапии, а также уменьшение стоимости и длительности лечения, количества побочных эффектов. В качестве решения данной проблемы предлагается проводить рутинную диагностику с помощью кожных проб у всех пациентов, сообщающих о реакциях на бета-лактамные антибиотики, особенно у лиц с низким риском [4].

Фторхинолоны находятся на втором после бета-лактамов месте по частоте развития реакций лекарственной гиперчувствительности. Существенной проблемой диагностики аллергии на фторхинолоны является невозможность применения кожных проб в связи с прямым раздражающим действием на тучные клетки кожи и, вследствие этого, высокого процента ложноположительных реакций [5].

Тест активации базофилов (BAT – basophil activation test) в ряде исследований зарекомендовал себя в качестве эффективного метода лабораторной диагностики гиперчувствительности немедленного типа на различные аллергены [6]. Однако наиболее востребованным и перспективным направлением является диагностика лекарственной аллергии. К настоящему времени в небольших исследованиях показана эффективность ВАТ для диагностики реакций гиперчувствительности на беталактамные антибиотики [7] и фторхинолоны [8]. Учитывая, что единого протокола постановки и интерпретации ВАТ (маркеры активации и дегрануляции, способы гейтирования базофилов, этап выделения мононуклеаров и другое) не существует, необходимы дополнительные исследования для оценки чувствительности и специфичности метода.

Цель исследования — оценить чувствительность и специфичность применения ВАТ (по маркерам CD63 и CD203c) в диагностике гиперчувствительности немедленного типа на антибиотики из групп бета-лактамов и фторхинолонов.

Объекты, материалы и методы исследования. Объектами исследования служили пациентов, В анамнезе которых наблюдались гиперчувствительности на антибактериальные средства системного применения, входящих в группы бета-лактамных антибиотиков и фторхинолонов Средний возраст пациентов составил 40 (29-53) лет. Отбор пациентов проводился врачамиспециалистами в учреждениях здравоохранения: УЗ «2-я городская поликлиника», УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер», УЗ «2-я городская клиническая больница», УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Минска», УЗ «10-я городская клиническая больница». Верификацию диагноза проводили на основании жалоб, анамнеза и клинического осмотра. Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев, в анамнезе которых отсутствовали аллергические реакции на какие-либо лекарственные средства (ЛС).

Постановка ВАТ. Образец крови в количестве 100 мкл инкубировали с ФМА (2 нг/мл) и anti-IgE (1 мкг/мл, клон 4H10) в качестве положительных контролей и исследуемыми ЛС минимум в 2-х концентрациях на протяжении 30 минут при 37°С. В каждую пробирку также был добавлен ИЛ-3 (2 нг/мл) с целью так называемой преактивации базофилов. После чего проводили остановку реакции кратковременной (1 минута) инкубацией пробирок при температуре –20°С. Добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами: CD63 – FITC, клон CLBGran/12 (Вескта Coulter, США), CD123 – PE, клон SSDCLY107D2 (Вескта Coulter, США), HLA-DR – PE-Cy 7, клон Immu-357 (Вескта Coulter, США), CD203с – APC, клон NP4D6 (ЕхВіо, Чехия) и инкубировали на протяжении 15 минут при 4°С в темноте. После лизиса эритроцитов хлоридом аммония на протяжении 15 минут при температуре 18–25°С в темноте клетки осаждали на центрифуге (5 минут 250 g), сливали супернатант и ресуспензировали в 200 мкл фосфатного буфера. Учет проводили на проточном цитофлюориметре BD FACSCalibur.

Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программ Statistica версии 12 (StatSoft, США), StatPlus версии 4.9 (AnalystSoft, Канада), MedCalc версии 17 (MedCalc Software, Бельгия). Значения показателей представлены в виде Ме (25 – 75), где Ме – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Диагностическую ценность показателей определяли с помощью метода ROC-анализа с расчетом площади под рабочей характеристической кривой (AUROC). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости р <0,05.

Результаты и обсуждение. В результате исследования проведена постановка ВАТ для 26 пациентов, в анамнезе которых наблюдались реакции гиперчувствительности немедленного типа на антибактериальные средства для системного применения из групп бета-лактамов и фторхинолонов.

Учитывая, что высокодостоверные методы лабораторной диагностики гиперчувствительности к ЛС отсутствует, подтверждение диагноза осуществляли с помощью тщательного сбора анамнеза. Включению подлежали случаи клинической картины острой крапивницы и/или анафилаксии, возникавшие после приема ЛС. Также у пациентов уточняли предшествующий прием подозреваемого ЛС (предполагаемая фаза сенсибилизация), случаи подобных симптомов без приема подозреваемого ЛС, и

наличие других аллергических заболеваний. Характеристика реакции гиперчувствительности и результаты ВАТ представлены в таблице.

Таблица – Данные анамнеза лекарственной гиперчувствительности группы пациентов и результаты BAT

N	Антибиотик	Возраст	Способ	Клинич.	Интервал	Период	%CD63				
		(лет)	приема	картина	между	времени	(проба)	ИА	A^{63}	ИА	λ^{203c}
				_	приемом	между	-				
					ЛС и	реакцией	%CD63				
					реакцией	и ВАТ	(OK)	C1	C2	C1	C2
						(мес)					
1	AM	22	п/о	О. Кр.	6 час	16 мес	10,1	1,8	2,3	1,6	2,4
2	ЦФт	31	$_{ m B/B}$	О. Кр.	10 час	8 мес	2,3	1,4	1,3	0,9	1,1
3	ЦФт	35	B/M	О. Кр.	1 час	3 мес	15,7	2,5	2,5	1,7	2,3
4	AM	49	п/о	Анаф.	10 мин	3 мес	24,3	2,4	2,5	1,6	2,1
5	ЦФу	42	в/м	О. Кр.	3 час	47 мес	4,4	1,5	1,4	1,0	1,0
6	ЛФ	29	п/о	О. Кр.	2 час	60 мес	2,3	1,1	1,2	1,4	1,5
7	AM	66	п/о	Анаф.	2 час	10 мес	17,4	1,8	2,1	1,6	1,9
8	МΦ	53	B/B	О. Кр.	20 мин	2 мес	31,8	3,1	3,0	2,4	2,5
9	ЦФп	41	B/B	О. Кр.	1 час	8 мес	5,1	1,6	1,7	1,4	1,3
10	ЦФт	30	B/M	О. Кр.	4 час	5 мес	6,3	1,6	1,6	1,8	1,7
11	AM	46	п/о	О. Кр.	2 час	12 мес	5,4	1,7	1,6	1,2	1,3
12	AM	36	п/о	О. Кр.	2 час	36 мес	2,1	1,8	1,9	1,4	1,6
13	ЦФт	22	B/B	О. Кр.	90 мин	8 мес	8,3	2,4	2,7	2,0	1,9
14	ЦФт	44	B/B	О. Кр.	3 час	10 мес	4,9	1,4	1,4	1,3	1,4
15	БП	27	B/B	О. Кр.	10 мин	12 мес	14,3	2,5	2,7	1,9	2,3
16	AM	19	п/о	О. Кр.	15 мин	4 мес	12,3	5,7	4,9	2,3	2,3
17	AM	59	п/о	Анаф.	5 мин	9 мес	12,7	3,8	3,5	2,4	2,3
18	AM	44	п/о	О. Кр.	2 час	10 мес	0,5	1,2	1,3	0,8	1,0
19	ΜФ	84	B/B	О. Кр.	40 мин	2 мес	0,7	1,6	1,7	2,2	2,0
20	AM	21	п/о	О. Кр.	30 мин	5 мес	14,1	3,9	3,4	7,1	2,9
21	ЛФ	56	B/B	О. Кр	1 час	10 мес	11,1	3,2	3,3	2,1	1,7
22	ЦФт	64	в/в	О. Кр	1 час	14 мес	8,6	2,9	2,8	2,7	2,7
23	AM	38	п/о	О. Кр	20 мин	11 мес	5,7	2,0	1,8	2,1	2,1
24	AM	25	п/о	О. Кр	90 мин	4 мес	6,9	2,5	2,4	1,6	1,4
25	БП	60	в/в	Анаф.	10 мин	10 мес	3,2	1,4	1,4	1,1	1,0
26	ЛФ	39	в/в	О. Кр	2 часа	3 мес	9,4	5,4	5,3	2,8	2,8
	иенания. АМ	l	l .								

Примечания: AM - амоксициллин, $B\Pi -$ бензилпенициллин, $U\Phi T -$ цефтриаксон, $U\Phi V -$ цефуроксим, $U\Phi T -$ певофлоксацин, $U\Phi T -$ цефепим, $U\Phi T -$ перорально, $U\Phi T -$ перорально, $U\Phi T -$ внутримышечно, $U\Phi T -$ внутривенно, $U\Phi T -$ острая крапивница, $U\Phi T -$ анафилаксия.

Образцы крови с гепарином в качестве антикоагулянта доставляли для исследования в течение не более чем 2 ч после забора крови. Температура хранения и транспортировки составляла $18-26\,^{\circ}$ С. Для проведения ВАТ рассчитывали нетоксичную концентрацию каждого ЛС путем тестирования не менее 5 концентраций на образцах периферической крови здоровых добровольцев. При этом использовалось от двух до трех разных образцов крови для исключения неспецифической активации базофилов у конкретного индивидуума. Таким образом, для исследования были подобраны следующие концентрации ЛС: бета-лактамные антибиотики и левофлоксацин – 0,2 и 2,0 мг/мл, моксифлоксацин – 0,5 и 0,1 мг/мл.

Анализ исследуемых образцов на проточном цитометре включал гейтирование базофилов среди мононуклеаров способом CD123⁺HLA-DR⁻ на цитограмме (рисунок 1).

Далее производили оценку экспрессии молекулы CD63 (%), а также интенсивности экспрессии молекулы CD203c (MFI) в отрицательном (ОК), положительном контроле (ПК) и пробирке с ЛС (проба).

Процент дегранулировавших базофилов в исследуемой пробирке должен составлять не менее 5%. Отвечаемость базофилов считалась достаточной при экспрессии CD63 в положительном контроле >20%. Процент дегранулировавших базофилов под действием лекарственных средств в контрольной группе (CD63⁺ базофилы) составил 4,3(2,9-5,7)%. Все образцы периферической крови контрольной группы и группы пациентов соответствовали критериям должного отрицательного (процент CD63⁺ базофилов ≤ 10 %) и положительных контролей (процент CD63⁺ базофилов ≤ 20 %).

С целью интерпретации результатов рассчитывали индекс активации (ИА), степень изменения экспрессии молекул, представляющего собой соотношение значения экспрессии в исследуемой пробе к ее значению в отрицательном контроле. Для оценки маркера дегрануляции CD63 ИА рассчитывался по соотношению процентного содержания CD63 $^+$ клеток в исследуемой пробе к CD63 $^+$ клеткам в отрицательном контроле (ИА 63). ИА для маркера активации CD203c (ИА 203c) рассчитывался по степени изменения интенсивности экспрессии.

Методом ROC-анализа установлена чувствительность и специфичность диагностики лекарственной аллергии по вышеперечисленным показателям, а также определена точка диагностически значимого уровня (cut-off point) — величина, используемая для разделения ряда значений на две части (т. е. пациенты с лекарственной аллергией и без нее). Графически результаты представлены на рисунке. Уровень cut-off point определяли по максимальному показателю чувствительности маркера (но не менее 1,4).

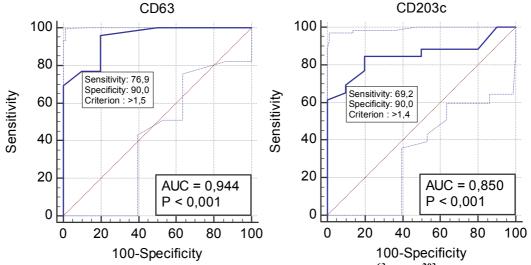


Рисунок – ROC-кривые чувствительности и специфичности UA^{63} и $\mathrm{UA}^{203\mathrm{c}}$ для выявления гиперчувствительности немедленного типа на антибиотики с помощью BAT

Таким образом, положительным считался результат при индексе активации $\rm UA^{63}$ >1,5 и $\rm UA^{203c}$ >1,4 (cut-off point). Установлено, что чувствительность выявления лекарственной аллергии по показателю $\rm UA^{63}$ составляет 76,9%, а специфичность – 90,0%; по показателю $\rm UA^{203c}$ – 69,2% и 90,0% соответственно.

По результатам исследования из 26 пациентов с гиперчувствительностью к антибиотикам в анамнезе положительные результаты ВАТ получены для 19 пациентов (73,08%). Такой высокий процент обусловлен прежде всего тщательно собранным анамнезом у данных пациентов, что служит краеугольным камнем для постановки диагноза лекарственной аллергии.

Причиной отрицательного результата ВАТ для двух пациентов (N 5 и 6, таблица) не смотря на яркую клиническую картину (острая крапивница через 3 и 2 часа после введения ЛС, соответственно), вероятно, служит длительный промежуток времени между реакцией гиперчувствительности и постановкой ВАТ. Известно, что уровень специфического IgE к ряду ЛС со временем снижается или исчезает вовсе. [9]. Поэтому диагностику немедленных реакций на ЛС рекомендуется проводить не позднее 1,5-2 года после реакции. [10]. У пациента N 19 были зарегистрированы несколько эпизодов острой крапивницы после курса антибиотикотерапии, что может указывать на дебют хронической спонтанной крапивницы и требовать более тщательного диагностического поиска.

Заключение. В большинстве случаев для лечения пациента назначается более одного лекарственного средства, что при необходимости значительно затрудняет диагностику аллергии. Учитывая, что антибиотики имеют принципиальное значение для лечения различных инфекций на протяжении жизни пациента, крайне важно подтвердить истинную аллергию. Необъективное, «подстраховочное» использование резервных антибиотиков влечет за собой как краткосрочные (побочные реакции, увеличение стоимости лечения), так и долговременные (формирование антибиотикорезистентности) последствия.

Таким образом, лабораторные методы является необходимым этапом диагностики лекарственной аллергии с целью постановки объективного диагноза. Полученные результаты демонстрируют, что ВАТ служит важным и высокоэффективным этапом диагностики на антибиотики бета-лактамной группы и фторхинолоны.

Литература

- 1. Prevalence of antibiotic use: a comparison across various European health care data sources / R. Brauer [et al.] // Pharmacoepidemiol. Drug Saf. 2016. Vol. 25, suppl. 1. P. 11-20
- 2. Har, D. Penicillin and beta-lactam hypersensitivity / D. Har, R. Solensky // Immunol. Allergy Clin. North Am. 2017. Vol. 37, No. 4. P. 643-662.
- 3. Self-reported drug allergy in a general adult Portuguese population / E. Gomes [et al.] // Clin. Exp. Allergy. 2004. Vol. 34. P. 1597-1601.
- 4. Penicillin allergy testing should be performed routinely in patients with self-reported penicillin allergy / D.M. Lang [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. Pract. -2017. Vol. 5. P. 333-334.
- 5. In vivo diagnostic tests in adverse reactions to quinolones / D.M. Venturini [et al.] // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2007. Vol. 17, No. 6. P. 393-398.
- 6. Basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease an overview / B. Eberlein [et al.] // Allerg. J. Int. 2016. Vol. 25. P. 106-113.
- 7. Use of the basophil activation test may reduce the need for drug provocation in amoxicillin-clavulanic allergy / M. Salas [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. Pract. -2018. Vol. 6. P. 1010-1018.
- 8. In vitro evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones / A. Aranda [et al.] // Allergy. 2011. Vol. 66, No. 2. P. 247-254.
- 9. Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins / T.D. Fernández [et al.] // Allergy. 2009. Vol. 64, No. 2. P. 242-248.
- 10. Natural evolution of skin-test sensitivity in patients with IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins / A. Romano [et al.] // Allergy. 2014. Vol. 69, No. 6. P. 806-809.

BASOPHIL ACTIVATION TEST FOR DIAGNOSIS OF IMMEDIATE TYPE HYPERSENSETIVITY REACTIONS TO BETALACTAMS AND FLUOROQUINOLONES

I.U. Ramanava^{1,2}, A.Y. Hancharou^{1,2}, A.I. Chalei³

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology; ²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus; ³2nd Central District Clinic of the Frunze District of Minsk, Minsk, Belarus

Blood samples from 26 patients with history of immediate-type hypersensitivity reactions to beta-lactams and fluoroquinolones were used. The BATs were performed using the degranulation marker CD63 and the activation marker CD203c. It was established that the sensitivity and specificity of BAT using CD63 molecule was 76.9% and 90.0% respectively; for CD203c molecule – 69.2% and 90.0%, respectively.

Keywords: basophil activation test, hypersensitivity, antibiotics

Поступила 20.11.2018

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ, ПЕРЕНОСИМОСТИ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ И ГОРТАНИ

В.Л. Чекан¹, Э.А. Стринкевич¹, Н.Г. Антоневич^{2,3}, А.Е. Гончаров^{2,3}

¹ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии микробиологии»;

³ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Резюме. Проведены клинические испытания метода лечения хронических стенозов трахеи и гортани с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки. Проведение клеточной терапии было безопасным и хорошо переносимым, позволило восстановить площадь просвета гортани, предотвратить рестенозирование и формирование рубцово-грануляционной ткани в течение 2-12 месяцев наблюдения у всех пациентов, включенных в клиническое испытание (n=7).

Ключевые слова: хронические стенозы трахеи и гортани, биомедицинский клеточный продукт, мезенхимальных стволовые клетки, обонятельная выстилка.

Введение. Проблема лечения хронических стенозов трахеи и гортани (ХСТГ) является актуальной как для Республики Беларусь, так и для всех стран мира. Увеличение количества пациентов с данной патологией обусловлено рядом факторов, в числе которых ведущее значение придается возрастающему числу сложных оперативных вмешательств с длительным интраоперационным и послеоперационным периодом искусственной вентиляции лёгких. В целом, современные методы, применяемые в интенсивной терапии и реаниматологии, позволяют значительно увеличить выживаемость пациентов, но, как следствие, это влечет за собой и увеличение числа пациентов с хроническими стенозами гортани и трахеи [1].

Используемые в настоящее время методы лечения рубцовых стенозов гортани и трахеи представляют собой различные варианты циркулярных резекций суженных участков дыхательного тракта с формированием соответствующих анастомозов. Однако существует ряд ограничений, не позволяющих выполнять вмешательства данного типа всем пациентам с ларинготрахеальными стенозами. Методом выбора восстановления просвета дыхательных путей при невозможности выполнить радикальное устранению стенозирующего участка вмешательство ПО является реконструктивно-восстановительное лечение с применением различных по конструкции стентов [2]. Несмотря на успехи в лечении данной патологии, не существует определенных критериев, позволяющих использовать однотипный Применяются разнообразные стенты при определенных стенозах, варьируют длительность стентирования, сроки наблюдения после извлечения стента, размеры ларинготрахеостом и методы их пластического закрытия [3]. Применение различных методов восстановления просвета дыхательных путей при сочетанных стенозах гортани и трахеи позволяет оптимизировать лечение пациентов. В то же время, основной проблемой восстановления просвета гортани и трахеи является рестенозирование с формированием хронических рубцово-грануляционных стенозов, что значительно снижает итоговую эффективность оперативного лечения данной категории пациентов и повышает стоимость лечения [4].

Для терапии дефектов слизистой верхних дыхательных путей перспективным направлением является проведение клеточной терапии с использованием биомедицинских клеточных продуктов (БМКП). Исследования, посвященные клеточной терапии стенозов немногочисленны, в большинстве предлагаемых методов в основе

лежит создание тканно-инженерных органов: скафолдов, заселенных хондроцитами, эпителиоцитами, фибробластами [5]. В случаях, когда ХСТГ не сопровождается повреждениями хрящевого каркаса эффективным методом для стимуляции регенерации эпителия является трансплантация мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки (МСК ОВ). В эксперименте на животных (собаки) клеточная терапия ХСТГ путем трансплантации МСК ОВ в суспензии и в виде монослоя на полилактидной пленке оказывала выраженный терапевтический эффект. По сравнению с контролем в опытной группе происходила практически полная эпителизация зоны дефекта без образования грануляций и рубцевания ткани, воспалительные процессы были выражены слабее [6].

Установлено, что МСК ОВ проявляют иммуномодулирующую активность в отношении иммунокомпетентных клеток, что может способствовать снижению интенсивности местного воспалительного процесса при стенозах и нормализации процессов эпителизации ткани [7–9]. МСК ОВ обладают высокой пролиферативной активностью, в короткие сроки возможно накопить терапевтически значимое количество клеточной биомассы для одного пациента. В настоящее время оптимизированы условия производства БМКП на основе МСК ОВ [10].

Таким образом, цель запланированных исследований – оценить безопасность, переносимость и предварительную клиническую эффективность клеточной терапии XCTГ с использованием аутологичных МСК OB

Материалы и методы исследования

Отбор пациентов. В клинические испытания включены пациенты с диагнозом ХСТГ верхнего отдела трахеи (J38.6 и J95.5 по МКБ-10) без нарушения целостности хрящевого каркаса с наличием или без наличия трахеостомы/ларингостомы, в том числе после хирургических вмешательств по восстановлению просвета гортани и трахеи (программа клинических испытаний утверждена В БелМАПО И РНПЦ оториноларингологии 15.03.2017, зарегистрирована под номером NCT03130374 в международной базе данных - https://clinicaltrials.gov). Пациенты подробно и на доступном уровне были ознакомлены с целью и технологией клеточной терапии, и необходимостью дополнительных лабораторно-диагностических информированного согласия у 7 пациентов произведен забор ткани ОВ для производства БМКП. Данные пациентов, анамнез и лечение, проведенное для восстановления просвета гортани и ревизии дыхательного тракта представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Данные пациентов, включенных в клинические испытания

№ пациента, пол, возраст	Лечение, полученное до проведения клеточной терапии
1/2017 (жен, 51 год)	В 2010 г. струмэктомия, в 2016 г. по экстренным показаниям выполнена трахеостомия. В 2016-2017 гг. до применения МСК 7 госпитализаций, 5 оперативных вмешательств под наркозом
2/2017 (муж, 76 лет)	В 2016 г выполнена трахеостомия по экстренным показаниям. В 2016-2017 гг. до применения МСК 3 госпитализации, 3 оперативных вмешательств под наркозом.
3/2017 (жен, 53 года)	В 2010 г наложена трахеостома после получения резанной раны шеи. В 2015-2017 гг. до применения МСК 15 госпитализаций, 14 оперативных вмешательств под наркозом
4/2017 (жен, 61 год)	в 2016 г для проведения эндотрахеального наркоза в связи с невозможностью эндотрахеальной интубации (анатомические особенности) наложена трахеостома. В 2017-2018 гг. до применения МСК 4 госпитализации, 3 оперативных вмешательства

	Продолжение таблицы 1
5/2018	В 2000-2002 гг. прошел этапное лечение по восстановлению просвета
(муж, 35 лет)	гортани и трахеи после интубации после ЧМТ. Ухудшение состояния в
	2018 г., до применения МСК 5 госпитализаций, 4 оперативных
	вмешательства.
6/2018	В 1989 г. и 1991 г. выполнялась частичная тиреоидотомия. В 1991 г. в
(жен, 63 года)	послеоперационном периоде возник парез гортани, лечение
	консервативное и фонопедическая коррекция. В 2017 г. наложена
	трахеостома по экстренным показаниям. В 2017-2018 гг. 3 госпитализации,
	2 оперативных вмешательства.
7/2018	В 2016 г. установлено трахеотомическая трубка после хирургического
(муж, 54 года)	лечения органического заболевания гортани. В 2017-2018 гг. до
	применения МСК 4 госпитализации, 3 оперативных вмешательства под
	наркозом.

В группу сравнения было включено 15 пациентов (7 мужчин и 8 женщин, медианный возраст -57(48-63,5) лет) с аналогичным диагнозом (ретроспективный и проспективный анализ).

Определение иммунофенотипа и жизнеспособности клеток. Клетки центрифугировали в фосфатном буфере (~200g) в течение 5 минут, резуспензировали в фосфатном буфере. Для определения экспрессии поверхностных молекул 50 мкл суспензии клеток смешивали с необходимым количеством антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD56, CD31, CD45, CD90, CD105, CD127, а также зонда 7-AAD и инкубировали 15 мин при +4°C. Отмывали несвязавшиеся антитела и зонд центрифугированием в фосфатном буфере. Клетки ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буфера для анализа. При анализе проб выделяли регион по параметрам прямого и бокового светорассеяния, в котором анализировали не менее 10 000 событий. Для анализа данных использовали программы Weasel 3.3 (WEHI, Австралия) и FlowJo10.

Контроль контаминации биологического материала. Для контроля бактериальной и грибковой контаминации 0,5 мл суспензии МСК ОВ вносили в 2 пробирки с тиогликолевой средой и среды Сабуро, соответственно. Помещали пробирки в термостат и инкубировали при 37 °C (тиогриколиевая среда) и 22 °C (среда Сабуро) в течение 14 суток, проводили визуально учет исследования. Для контроля контаминации микоплазмами использовали 5–7 суточную культуру МСК ОВ, монослой фиксировали метанолом при –20 °C на протяжении 10 минут, промывали клетки фосфатным буфером, окрашивали 0,5 % раствором Ноеchst-33258 10 минут. Учитывали результаты на флуоресцентном микроскопе Nikon TE2000-E (×100–400) с применением полосовых фильтров 330–350 нм, 420–450 нм. Контроль контаминации герпесвирусами ВПГ 1 и 2, ВЭБ, ЦМВ, ВГ-6 осуществляли методом ПЦР с использованием коммерческих тестсистем.

Производство БМКП. Первичные культуры получали методом эксплантов Клетки пересевали в пассажах по стандартной методике с использованием 0,01% трипсина в растворе Версена (0,02% ЭДТА в фосфатно-солевом буфере). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% v/v эмбриональной телячьей сыворотки в CO2-инкубаторе (5% CO2) при влажности 95% и 37°С. На этапе производства БМКП клетки переводили в суспензию, удаляли остатки трипсина и культуральной среды центрифугированием при 200g, затем еще 2 раза отмывали центрифугированием в 0,9% водном растворе хлорида натрия (физраствор). Для непосредственного введения пациентам клетки ресуспензировали в 10% растворе человеческого альбумина в концентрации 10 млн/мл, хранили не более 8 ч при +4°С [10].

Проведение клеточной терапии. При первом применении МСК ОВ для предотвращения возможных аллергических реакций немедленного типа проводили кожный тест, для чего вводили подкожно в область медиальной поверхности предплечья 0,1 мл взвеси клеток. Через 30 мин при отсутствии системных и местных реакций использовали оставшуюся взвесь МСК ОВ. Во время оперативного вмешательства по восстановлению просвета дыхательных путей после удаления грануляционной ткани трахеи и/или гортани по периметру и всей площади деэпителизированного участка инсулиновым шприцем вводили подслизисто единичными инъекциями по 100-200 мкл суспензию МСК ОВ. На участок площадью до 2 cm^2 использовали 1 единичную дозу БМКП - 20 млн. клеток в <math>2 мл. В послеоперационном проводили фиброскопический периоде восстанавливаемого участка.

<u>Статистический анализ.</u> Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Mean±StdErr и Me (25–75). Использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости p<0,05.

Результаты исследования и обсуждение

Производство и характеристика БМКП. Для обеспечения биобезопасности при производстве БМКП осуществлен контроль культур на соответствие следующим критериям: 1) внешний вид клеток при росте в монослойной культуре — фибробластоподобная морфология; 2) подлинность — >90% клеток экспрессируют CD90 и CD105, <3% клеток экспрессируют CD31 и CD45; 3) жизнеспособность клеток — >90%; 4) микробиологическая безопасность — отсутствие контаминации бактериями, микоплазмами, грибами, герпесвирусами.

протяжении всех сроков культивирования клетки сохраняли фибробластоподобную морфологию, жизнеспособность составляла >97%, фенотип CD90⁺CD105⁺CD31⁻CD45⁻, не выявлено контаминации микроорганизмами (бактерии, грибы, микоплазмы, герпесвирусы). Таким образом критериям подлинности, жизнеспособности. МСК OB удовлетворяли микробиологической безопасности в соответствии с постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 28.11.2014 № 1120 «О некоторых вопросах государственной регистрации биомедицинских клеточных продуктов».

Проводили оценку пролиферативной активности клеток, сроков формирования первичных культур. Сроки формирования первичных гетерогенных по клеточному составу первичных культур ОВ составили 22(21–28) суток. Высокая пролиферативная активность клеток позволила к 4–6 пассажу накопить биомассу клеток, необходимую для производства не менее 1 единичной дозы БМКП (20 млн. клеток) (таблица 2).

Таблица 2. – Характеристика культур клеток ОВ пациентов, производства БМКП

Код	Рост первичной	Индекс пролиферации,	Число	Произведено
пациента	культуры, сут.	усл. ед.	пассажей	БМКП, ед. доз
1/2017	28	3–3,5	5	1
2/2017	20	4–10	5	1,5*
3/2017	23	4,2-8,2	4	1
4/2017	21	4,5–11,7	4, 6	2,5 (1* и 1,5*)
5/2018	22	5,9–8,5	4, 6	3 (2* и 1*)
6/2018	28	6,1-7,2	5	1,25*
7/2018	22	5,8-7,8	4	3

Примечание: * - клетки восстановлены из криоконсервации.

Таким образом от забора биоптата OB до этапа накопления терапевтически значимого количества биомассы требовалось 4–7 недель. Биомасса МСК OB всех пациентов была криоконсервирована для длительного хранения и возможности производства БМКП к срокам проведения запланированного хирургического вмешательства (таблица 2).

Результаты клеточной терапии ХСТГ. После выполнения очередного этапа хирургического лечения по данным фиброларинготрахеоскопии трахеи и гортани в послеоперационном периоде без проведения клеточной терапии (стандартный протокол лечения) в течение последующих 7 суток наблюдения отмечается выраженный отек слизистой оболочки, происходит рост грануляционной ткани, на поверхности дефекта слизистой выявлялась фибриновая пленка. Выраженное разрастание соединительной ткани требовало у пациентов, включенных в клинические испытания повторных хирургических вмешательств спустя 2–3 месяца (таблица 1).

После проведения клеточной терапии в ранний постоперационный период (5–7 суток) отмечалось отсутствие воспалительных проявлений или иных локальных и местных реакций, незначительный налет фибрина. В результате осмотра пациентов через 1–2 месяца не выявлены признаки рестенирования — роста грануляционной ткани, образования рубцов, сужения просвета гортани (рисунок).

 Трахея до клеточной терапии
 Трахея после клеточной терапии

 Гортань до клеточной терапии
 Гортань после клеточной терапии

Рисунок — Фиброларинготрахеоскопия трахеи и гортани пациентки 1/2017 ретроградно — до применения БМКП после выполнения очередного этапа хирургического лечения по восстановлению просвета гортани, трахеи, и через 2 месяца после проведения клеточной терапии (стрелками указаны выросты грануляционной ткани)

Пациентке 4/2017 потребовалось повторное введение БМКП, так как на первом этапе клеточной терапии не удалось полностью восстановить слизистую по причине плохой переносимости пациенткой стента. В результате повторного проведения клеточной терапии удалось достигнуть отсутствия рестенирования — роста грануляционной ткани, образования рубцов, сужения просвета гортани.

Пациенту 5/2017 проведена клеточная терапия в 2 этапа. Спустя 1 месяца после первого этапа трансплантации МСК ОВ был восстановлен участок на уровне гортани/верхнего отдела трахеи в этом участке не выявлены признаки рестенирования. Повторное введение МСК ОВ потребовалось в область сохраняющего рестенирования – верхний/ частично средний отдел трахеи, куда первый раз БМКП не вводили.

Применение БМКП на основе МСК ОВ в этапном лечении позволило выполнить деканюляцию всем пациентам через 2–7 дней после введения БМКП в местах удаленных грануляций. Трахеостома закрылась самопроизвольно в течение 1 месяца у 2-х пациентов, 5 пациентам выполнена пластика трахеостомы в течение 2–4 месяцев после трансплантации аутологичных МСК ОВ.

Число госпитализаций после применения стволовых клеток до пластики трахеостомы составило 1—2. Средний срок пребывания в стационаре 7 дней. В настоящее время все пациенты наблюдаются амбулаторно без признаков нарастающей дыхательной недостаточности — по данным спирометрии, без признаков гранулирования (или иного рестенозирования) — по данным фиброларинготрахеоскопии.

Статистическую значимость различий между качественными характеристиками в основной группе и группе сравнения оценивали при помощи критерия χ2 (таблица 3).

Таблица 3. – Эффективность лечения пациентов с XCTГ основной группы и группы сравнения

Показатель	Основная группа (n = 7)	Группа сравнения (n = 12)	Достоверность различий – р (по критерию х²)
Отсутствие формирования рубцово- грануляционной ткани	7/7	3/15	0,0004
Эпителизация >90 % дефектов внутренней поверхности гортани/трахеи	7/7	5/15	0,0034
Улучшение дыхания и повышение толерантности к физической нагрузке	7/7	5/15	0,0034
Восстановление площади просвета гортани и трахеи в анатомических ориентирах	7/7	4/15	0,0014
Отсутствие рестенозирования	7/7	3/15	0,0004

Полученные результаты свидетельствуют, что дополнительное проведение клеточной терапии к стандартному лечению XCTГ статистически достоверно улучшает все показатели, характеризующие восстановление просвета трахеи/гортани.

Переносимость и безопасность метода клеточной терапии на основании обследования и изучения лабораторных показателей 7 пациентов до начала терапии, во время их проведения и после окончания оценена как хорошая — постинъекционные реакции и/или побочные местные и системные явления отсутствовали (зуд в месте инъекции, отечность/инфильтрация прилежащих тканей, повышение температуры тела, аллергические реакции). В результате изучения иммунного статуса пациентов установлено, что все показатели находились в пределах нормы, отсутствовали признаки

иммуносупрессии: не выявлено существенного увеличения содержания T-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{hi}CD127^-$), снижения индекса CD4/CD8 и др.

Заключение. Проведены клинические испытания метода клеточной терапии ХСТГ с использованием БМКП на основе МСК ОВ, программа клинических зарегистрирована под номером NCT03130374 в международной базе данных – https://clinicaltrials.gov.

Клеточная терапия представляла собой одно- и двукратное введение суспензии МСК ОВ в расчете 10 млн. клеток на 1 см² площади дефекта слизистой оболочки в дополнение к стандартному хирургическому лечению.

Переносимость и безопасность метода клеточной терапии на основании оценки клинико-лабораторных показателей всех пациентов (n=7) до начала терапии, во время их проведения и после окончания определена как хорошая – постинъекционные реакции и/или побочные местные и системные явления, в том числе признаки системной иммуносупрессии отсутствовали.

Дополнительное проведение клеточной терапии к стандартному хирургическому лечению $XCT\Gamma$ статистически достоверно улучшает восстановление площади просвета гортани в анатомических ориентирах, уменьшает количество случаев рестенозирования и формирования рубцово-грануляционной ткани, приводит к увеличению площади эпителизации слизистой, улучшению показателей дыхания и повышению толерантности к физической нагрузке у пациентов основной группы (n=7) с сравнении с группой сравнения (n=15).

В настоящее время все пациенты после проведения клеточной терапии наблюдаются амбулаторно без признаков нарастающей дыхательной недостаточности – по данным спирометрии, без признаков гранулирования (или иного рестенозирования) – по данным фиброларинготрахеоскопии.

Полученные данные свидетельствуют о безопасности, хорошей переносимости и клинической эффективности метода клеточной терапии $XCT\Gamma$ с использованием аутологичных MCK OB.

Литература

- 1. Causes and consequences of adult laryngotracheal stenosis / A. Gelbard [et al.] // Laryngoscope. 2015. Vol. 125, No. 5. P. 1137-1143.
- 2. Зенгер, В.Г. Хирургия повреждений гортани и трахеи / В.Г. Зенгер, А.Н. Наседкин, В.Д. Паршин. М.: Медкнига, 2007. С. 334-348.
- 3. Чайковский, В.В. Опыт применения стентов различных типов при лечении хронических стенозов гортани и трахеи / В.В. Чайковский, В.Л. Чекан, С.Н. Моради // Актуальные проблемы оториноларингологии: материалы 2-й междунар. Белор.-Польск. конф. по оториноларингологии. Гродно, 2003. С. 70-72.
- 4. Морфологические изменения в трахее при постинтубационном рубцовом стенозе / М.К. Недзведзь [и др.] // Мед. журн. -2008. № 1. С. 43-46.
- 5. Tissue-engineered tracheae: a review / J.X. Law [et al.] // Int. J. Pediatric Otorhinolaryngology. 2016. Vol. 91. P. 55-63.
- 6. Сравнительная характеристика эффективности способов и условий трансплантации с использованием стволовых и прогениторных клеток обонятельного эпителия животным с экспериментальной травмой трахеи и гортани / В.Л. Чекан [и др.] // Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток (Шифр «Стволовые клетки», 2010 2013 гг.)»: материалы науч.-техн. совета Программы Союзного государства, Минск, 21 мая 2013 г. Минск, 2013. С. 39-46.

- 7. Антоневич, Н.Г. Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека // Н. Г. Антоневич, А.Е. Гончаров, В.Л. Чекан // Здравоохранение. -2014. -№ 10. C. 14-19.
- 8. Подавление цитотоксической функции CD8+ Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток мезенхимальными стволовыми клетками обонятельной выстилки полости носа / Н.Г. Антоневич [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 2017. N_2 4. С. 7-16.
- 9. Antonevich, N. Olfactory epithelium-derived mesenchymal stem cells impact antigenpresenting cells when co-cultured ex vivo [Electronic resource] / N. Antonevich, A. Hancharou, L. Du Buske // European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2017, Helsinki, Finland, 17–21 June 2017: abstr. [Publ. in] Allergy. 2017. Vol. 72, suppl. 103. P. 477, # 0795. Mode of access: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.13252/epdf. Date of access: 13.11.2018.
- 10. Гончаров, А.Е. Метод получения биомедицинского клеточного продукта на основе мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки носовой полости [Электронный ресурс] / А.Е. Гончаров, Н.Г. Антоневич // Достижения медицинской науки Беларуси : науч. рец. полнотекст. база данных Минск : ГУ РНМБ, 2016. Вып. 21. Режим доступа: http://med.by/dmn/book.php?book=16-19_3. Дата доступа: 22.10.2017.

EVALUATION OF SAFETY, TOLERANCE AND PRELIMINARY CLINICAL RESULTS OF OLFACTORY MUCOSA-DERIVED MESEMCHYMAL STEM CELL THERAPY FOR LARYNGOTRACHEAL STENOSIS

V.L. Chekan¹, E.A. Strinkevich¹, N.G. Antonevich^{2,3}, A.Y. Hancharou^{2,3}

¹Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education; ²Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology; ³Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Clinical trials of laryngotracheal stenosis using autologous olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells were carried out. The cell therapy was safe and well tolerated. After stem cells transplantation restoration of normal epithelium was observed. Mesenchymal stem cell therapy prevented restenosis, growth of granulation tissue and the formation of scar within 2-12 months after surgery.

Keywords: chronic laryngeal stenosis, biomedical cell product, mesenchymal stem cells, olfactory mucosa

Поступила 21.11.2018

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТРАТЕКАЛЬНОГО СИНТЕЗА АНТИТЕЛ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПОРАЖЕНИЙ ЦНС

В.Р. Шагинян, И.В. Фильчаков, Ю.В. Парфенюк, П.А. Дьяченко, А.А. Руденко, С.П. Борщов, Л.В. Березина, Е.Л. Панасюк

ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины», Киев, Украина

Резюме. В работе представлены данные собственных исследований по использованию методов определения интратекального синтеза (ИТС) антител в этиологической и дифференциальной диагностике поражений центральной нервной системы. Авторами предложен алгоритм лабораторного обследования пациентов с поражением нервной системы. Отмечается, что на первом этапе целесообразно определять ИТС общего IgG. Второй этап исследований направлен на проведение дифференциальной диагностики между инфекционными и аутоиммунными заболеваниями, для чего можно использовать метод определения интратекального синтеза специфических антител.

Ключевые слова: интратекальный синтез антител, лабораторная диагностика, поражения центральной нервной системы.

Введение. Современные исследования позволяют говорить о разнообразной этиологии поражений центральной нервной системы (ЦНС). Наибольшая доля среди них принадлежит энцефалитам и менингоэнцефалитам. Помимо инфекционного генеза энцефалитов, выделяют аутоиммунный, в том числе постинфекционный и поствакцинальный [1, 2]. Достаточно большая группа поражений ЦНС связана с развитием паранеопластических процессов. К отдельной группе можно также отнести васкулиты ЦНС.

Поражения ЦНС инфекционной природы относятся к тяжелой патологии и по данным литературы, могут быть вызваны более чем 100 патогенами, которые варьируют в зависимости от географического региона [3]. В большинстве стран превалируют энцефалиты арбовирусной и герпесвирусной этиологии [4].

Несмотря на особенности патогенеза поражений нервной системы, связанных с этиологическим фактором, отмечаются общие механизмы, присущие хроническому нейроинфекционному процессу, который часто сопровождается нарушением иммунного ответа и развитием иммунопатологических реакций [5]. Такие особенности патогенеза нейроинфекций лежат в основе сложности дифференциальной диагностики инфекционных поражений ЦНС и обусловливают актуальность проблемы ее совершенствования.

Специфическая лабораторная диагностика инфекционных поражений ЦНС является краеугольным камнем для назначения этиотропной, патогенетической терапии, прогноза течения болезни.

Современные методы диагностики инфекционных поражений ЦНС направлены на определение этиологического фактора, активности инфекционного процесса, степени нарушения гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров (ГЭБ/ГЛБ). В настоящее время для определения этиологии и активности инфекционного процесса в интратекальном пространстве широко используют молекулярно-генетические методы исследования, в частности исследования методом ПЦР, который позволяет выявлять в спинномозговой жидкости (СМЖ) фрагменты нуклеиновых кислот, наиболее распространенных нейротропных вирусов. В то же время нельзя не учитывать, что данный метод является наиболее эффективным в диагностике острых инфекционных

процессов, но при хронических поражениях нервной системы вирусного генеза, даже при его обострении, уровень вирусной нагрузки может быть ниже порога чувствительности метода. Некоторые врачи используют методы определения специфических антител к возбудителям нейроинфекций, наиболее часто метод ИФА. Однако, выявление антител в СМЖ без определения их количественных показателей не может служить доказательством этиологии данного заболевания, поскольку ГЭБ / ГЛБ не является препятствием для проникновения специфических антител и иммуноглобулинов класса G (IgG) из кровеносного русла.

В настоящее время продолжаются исследования по изучению интратекального синтеза (ИТС) антител или общих IgG. ИТС антител или IgG выявляется в половине случаев, обусловленных воспалительным процессом в ЦНС. Также установлено, что выявление ИТС антител к возбудителям кори, краснухи и вируса опоясывающего лишая (так называемая «МRZ-реакция») является дифференциально-диагностическим маркером хронических воспалительных аутоиммунных процессов, специфичность которого превышает 90% [6, 7].

Цель работы: определить частоту интратекального синтеза общего IgG и специфических антител к нейротропным возбудителям у пациентов с поражениями ЦНС. На основании полученных данных предложить стратегию лабораторного обследования данной группы пациентов.

Материалы и методы исследования. Определение ИТС общих IgG проведено у 90 пациентов, поступивших в Центр инфекционных поражений нервной системы ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины». Среди них было 30 мужчин (33,3%) и 60 женщин (66,6%), в возрасте 21-70 лет (средний возраст составил 38,9±9,8). Такое же количество пациентов (90) было обследовано на наличие специфических антител к нейротропным возбудителям и определением ИТС специфических антител. Группы пациентов статистически не различались по половозрастным характеристикам и предварительным диагнозам. В обеих группах преобладали пациенты с предварительным диагнозом энцефалит, энцефаломиелит.

Количественное определение общих IgG (в мг/л) проводилось в сыворотке крови (СК) и спинномозговой жидкости (СМЖ) с помощью метода иммунотурбидиметрии на сертифицированном автоматическом биохимическом анализаторе Cobas 311 (Roche, Швейцария) с использованием реагентов фирмы Roche. Забор крови и СМЖ проводился с интервалом не более одного часа. Расчет индекса IgG проводился по формуле: индекс IgG = общий ІgG в СМЖ х сывороточный вльбумин в СМЖ.

Для определения показателей ИТС специфических антител проведены исследования СК и СМЖ методом ИФА с использованием тест-систем «Euroimmun» (Германия) на сертифицированном оборудовании «Lab Line» (Китай). Количественное определение специфических антител класса IgG (в УЕ/мл) в СК и СМЖ проведено с использованием наборов к следующим нейротропным возбудителям: вирусу простого герпеса 1/2 типа (Ab HSV 1/2), цитомегаловирусу (Ab CMV), вирусу Эпштейна-Барр (Ab EBV), вирусу опоясывающего лишая (Ab VZV), вирусу кори (Ab Msls.), вирусу краснухи (Ab Rub), боррелиям (Ab Bor). Расчет ИТС специфических антител проводили по методике H. Reiber [8].

Количественное определение альбумина в СМЖ (мг/л) и в СК (г/л) проводили методом иммунотурбидиметрии. С целью установления дисфункции ГЭБ/ГЛБ определяли коэффициент альбумина (Qalb): соотношение концентраций альбумина в

СК и СМЖ. Степень дисфункции ГЭБ/ГЛБ устанавливали с использованием критериев Schliep-Felgenhauer [9].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью компьютерной программы Excel.

Результаты исследования и обсуждение. У 30 (33,3 \pm 6,1%) пациентов был выявлен ИТС общих IgG с индексом выше 0,6, что является свидетельством воспалительного процесса в ЦНС. Средний возраст пациентов с ИТС общих IgG не отличался от среднего возраста пациентов в группе и составил 38,1 \pm 9,9 лет. В то же время среди пациентов с ИТС IgG преобладали женщины (22 из 30 – 73,3%). Следует подчеркнуть, что у большинства пациентов с ИТС IgG отсутствовали выраженные изменения показателей СМЖ: цитоз был менее 10 клеток, общий белок был в пределах нормы. У большинства из них не выявлена дисфункция ГЭБ/ГЛБ.

ИТС специфических антител, во второй группе, был выявлен у 23 из 90 (25,6±4,6%) обследованных пациентов. Наличие ИТС антител мы сравнили с частотой выявления антител в СМЖ (рисунок). Антитела к вирусам простого герпеса и Эпштейна-Барр в СМЖ присутствовали у всех обследованных пациентов, но частота интратекального синтеза антител к указанным возбудителям при их наличии в СМЖ была относительно невысокой (30,4% и 34,8% соответственно). При обнаружении в СМЖ антител к вирусу кори, в большинстве случаев выявлялся ИТС антител к этому вирусу. В то же время, антитела к СМV в СМЖ присутствовали у 87% обследованных, а ИТС к этому вирусу оказывался лишь у 25% пациентов, у которых антитела были выявлены в СМЖ. Следует отметить, что у 75% пациентов, у которых в СМЖ были обнаружены антитела к боррелиям, установлен их интратекальный синтез.

Приведенные данные наглядно демонстрируют, что обнаружение специфических антител в СМЖ не может рассматриваться как фактор, подтверждающий этиологию поражения ЦНС. В то же время показана диагностическая ценность метода определения ИТС антител.

При выявлении у пациента ИТС только к одному из возбудителей нейроинфекций, этиология поражения ЦНС становится более очевидной. Так, выявление ИТС к боррелиям является специфичным тестом, говорящим в пользу нейроборрелиоза. По нашим данным у всех пациентов с наличием ИТС к боррелиям отсутствовала интратекальная продукция антител к другим возбудителям. Как правило, нейроборрелиоз приходится исключать у пациентов с подтвержденным в иммунном блоте положительным результатом исследования СК. Боррелиоз является эндемичной для некоторых регионов Украины инфекцией, поэтому число инфицированных и больных боррелиозом достаточно высоко. В то же время, выявление антител к боррелиям в СК не всегда является достаточным для установления диагноза нейроборрелиоз, поскольку поражение ЦНС может быть другой, например, герпесвирусной этиологии и протекать на фоне перенесенной (или текущей) боррелиозной инфекции. При этом тактика лечения таких пациентов будет различаться.

В наших исследованиях более чем в половине случаев ИТС был установлен к двум или трем возбудителям одновременно. ИТС различной специфичности, в частности к вирусу кори, краснухи, VZV (более известный как «МRZ-реакция») характерен для ряда аутоиммунных поражений ЦНС, в частности для рассеянного склероза [6, 10]. Дальнейшие исследования, проведенные у 5 пациентов с «МRZ-реакцией», позволили подтвердить у них аутоиммунное поражения ЦНС.

Сравнение результатов определения ИТС IgG и ИТС специфических антител позволяют говорить об отсутствии статистических различий в показателях выявления ИТС общих IgG (33,3 \pm 6,1%) и ИТС специфических антител (25,6 \pm 4,6%) при

использовании менее трудоемкой и более дешевой методики определения ИТС IgG. Таким образом, можно говорить о целесообразности определения ИТС общих IgG на первом этапе обследования пациентов, что позволит выделить группу больных с наличием ИТС IgG для определения на втором этапе специфического этиологического фактора или подтверждения аутоиммунной природы поражения ЦНС.

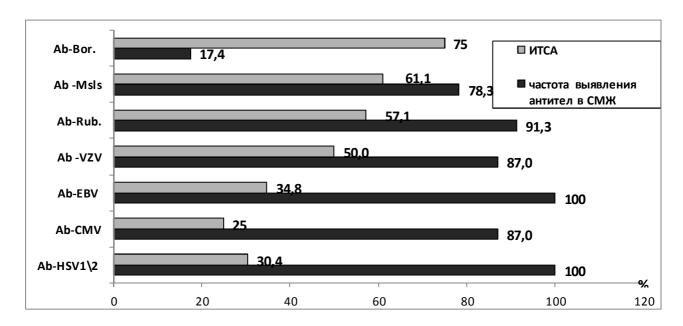


Рисунок – Частота выявления специфических антител и выявление ИТС у обследованных пациентов

На основании обобщения данных литературы и собственных исследований мы предлагаем следующий алгоритм обследования пациентов с поражением нервной системы.

Первым этапом исследования является клинический анализ СМЖ, который рекомендуется проводить в срок до 30 минут с момента забора биоматериала. Он включает определение в СМЖ количества и состав клеточных элементов, общий белок и глюкозу (последний показатель одновременно определяют и в СК). На первом этапе устанавливается наличие или отсутствие патологических изменений СМЖ, а также предположительно бактериальная или вирусная природа процесса (при его наличии). Также (в течении 3-х часов от момента забора материала) определяют уровень альбумина и уровень общего IgG в СМЖ и СК. На основании этих данных проводят расчет показателей проницаемости ГЭБ/ГЛБ и наличие или отсутствие ИТС общего IgG.

Для этиологической верификации вирусного поражения ЦНС на втором этапе проводится исследование ликвора методом ПЦР. Перечень возбудителей для проведения ПЦР-исследования зависит от эпидемиологического анамнеза, времени года, эндемичности инфекций т.д. Следует помнить, что диагностическая ценность метода ПЦР высока при остром менингите (энцефалите) и крайне низка при хроническом процессе в ЦНС. Одновременно можно определять маркеры активности инфекционного процесса (ДНК/РНК вирусов, специфические IgM) в СК, однако уровень доказательности положительных результатов для установления этиологии поражения ЦНС невелик.

На втором этапе исследований может возникнуть необходимость в дифференциальной диагностике между латентными (хроническими) инфекционными и аутоиммунными поражениями ЦНС. В данном случае установление этиологии заболевания определяет тактику лечения, которая будет различаться при заболеваниях инфекционной и аутоиммунной природы. Помощь в установлении этиологии хронического инфекционного процесса ЦНС может оказать определение ИТС специфических антител. Полученный положительный результат исследования в совокупности с клиническими и анамнестическими данными, а также результатами нейровизуальных исследований позволяют подтвердить диагноз и назначить соответствующую терапию.

В случае невозможности установления диагноза при проведении указанных двух этапов исследования, возникает необходимость в проведении дополнительных исследований, которые следует проводить с аликвотами замороженной СМЖ и СК. К дополнительным исследованиям мы относим специфические тесты, направленные на установление аутоиммунного поражения, васкулита ЦНС, паранеопластического процесса. Для проведения таких исследований можно использовать коммерческие тестсистемы ДЛЯ иммуноферментного или иммунофлюоресцентного Определенную помощь могут оказать как исследования, направленные на установление активности воспалительного процесса (определение С-реактивного белка в сыворотке и преальбумина в ликворе) и/или определение наличия и степени демиелиниризущего процесса в ЦНС (определение общего белка миелина, белка S100, NSE и др.).

Выводы. Методы определения интратекального синтеза антител расширяют возможности этиологической и дифференциальной диагностики поражений ЦНС. Особое значение они приобретают для пациентов с хроническим течением заболевания. В проведении лабораторных исследований рационально выделять два этапа. Результаты первого этапа исследований (цитоз, белок – СМЖ, альбумин, IgG – СК и СМЖ) с высокой степенью достоверности позволяют определить случаи острого инфекционного процесса. Второй этап исследований направлен на проведение инфекционными дифференциальной диагностики между И аутоиммунными заболеваниями. Метод определения ИТС специфических антител – при подозрении на хронический инфекционный процесс может быть более эффективным по сравнению с методом ПЦР, который при хроническом процессе может давать отрицательный результат.

Литература

- 1. Пономарев, В.В. Аутоиммунные заболевания в неврологии / В.В. Пономарев. Минск: Беларус. навука, 2010. 259 с.
- 2. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the International Encephalitis Consortium / A. Venkatesan [et al.] // Clin. Infect. Dis. $-2013.-Vol.\ 57$, No. $8.-P.\ 1114-1128$.
- 3. Infectious causes of encephalitis and meningoencephalitis in Thailand, 2003-2005 / S.J. Olsen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. 2015. Vol. 21, No. 2. P. 280-289.
- 4. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project 1998–2000 / C.A. Glaser [et al.] // Clin. Infect. Dis. 2003. Vol. 36. P. 731-742.
- 5. Карпов, И.А. Энцефалиты в клинической практике так ли все просто? / И.А. Карпов, Е.Ф. Качанко, А.И. Василенко // Клинч. микробиол. антимикроб. химиотер. 2011. T. 13, № 2. C. 104-134.

- 6. Bonnan, M. Intrathecal IgG synthesis: a resistant and valuable target for future multiple sclerosis treatments [/ M. Bonnan // Multiple Sclerosis Int. 2015. Vol. 2015. Article ID 296184. http://dx.doi.org/10.1155/2015/296184.
- 7. Rosche, B. Measles IgG antibody index correlates with T2 lesion loadon MRI in patients with early multiple sclerosis / B. Rosche, S. Laurent, S. Conradietal // PLoS ONE. -2012.-Vol. 7, No. 1.-e28094.
- 8. Reiber, H. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data pattern sand evaluation programs / H. Reiber, J. Peter // J. Neurol. Sci. 2001. Vol. 184, No. 2. P. 101-122.
- 9. Schliep, G. Serum-CSF protein gradients, the blood-CSF barrier and local immuneresponse / G. Schliep, K. Felgenhauer // J. Neulor. 1978. Vol. 218, No. 2. P. 77-96
- 10. Oligoclonal restriction of antiviral immunoreaction in oligoclonal band-negative MS patients / O. Stich [et al.] // Acta Neurol. Scand. 2015. Vol. 131, No. 6. P. 381-388. doi: 10.1111/ane.12350.

METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIBODY INTRATHECAL SYNTHESIS IN THE LABORATORY DIAGNOSTISIS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM DAMAGES

V.R. Shaginyan, I.V. Filchakov, Y.V. Parfenyuk, P.A. Dyachenko, A.O. Rudenko, S.P. Borshov, L.V. Berezina, E.L. Panasyuk

L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The paper presents data obtained from our own research on the use of methods for determination of antibody intrathecal synthesis (ITS) in etiological and differential diagnostics of the central nervous system damages. The authors proposed an algorithm for laboratory examination of patients with central nervous system damages. It was noted that at the first stage it was advisable to determine the total IgG ITS. The second stage of researches was directed to perform differential diagnostics between infectious and autoimmune diseases, for which can use the method of determination of specific antibodies (IgG) ITS.

Keywords: antibody intrathecal synthesis, laboratory diagnostics, central nervous system damages.

Поступила 20.11.2018

СОСТОЯНИЕ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТАХ ВТОРИЧНОЙ ИНФЕКЦИИ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Ю.И. Ярец

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

Резюме. В статье отражены результаты анализа клинического. микробиологического и иммунологического обследования 105 пациентов с вторичными инфекциями кожи и мягких тканей. представленные длительно-незаживающими раневыми дефектами различной этиологии и сроков давности. Сравнение показателей выполнялось относительно группы пациентов (n=25) с чистыми линейными послеоперационными ранами. На фоне инфекции раны выявлено повышение относительного содержания Т-клеток, НК-клеток, снижение CD4+CD38+CD3+ и CD8+CD38+CD3+, CD19+HLADR+, CD11a, CD11b, CD11c, CD71, повышение CD3+HLADR+. При грамположительной инфекции степень экспрессии CD19+HLADR+ и CD11с на нейтрофилах была значительно выше, чем при грамотрицательной инфекции.

Ключевые слова: инфекции кожи и мягких тканей, длительно-незаживающие раны, иммунофенотипирование лейкоцитов, многоцветная проточная цитофлюориметрия, ассоциативная микрофлора

Введение. Гнойно-воспалительные заболевания остаются актуальной проблемой медицины, поскольку во многом являются проявлением госпитальных инфекций, фактором хронизации патологии и итогового снижения качества жизни/здоровья пациентов. В основе развития гнойно-воспалительных процессов у пациентов является снижение иммунологической реактивности, циркуляции в стационарах поливалентной антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов со сниженной вирулентностью и других причин [1]. Основной источник инфекций кожи и мягких тканей – ассоциативная микрофлора, контаминирующая и колонизирующая поверхность кожи, а наличие раны VСЛОВИЯ ДЛЯ пролиферации микроорганизмов. микроорганизмы играют первостепенную роль в задержке раневого заживления и формирования длительно-незаживающих ран, а также развития различных осложнений репаративного процесса. Персистенция бактерий в ране активирует клеточные механизмы иммунной защиты, создавая дисбаланс в их работе. В связи с тем, что инфекция в ране развивается медленно и персистирует длительно, нормализация разбалансированных иммунных механизмов также происходит медленно, либо стабилизируется на определенном уровне, поддерживая хроническое воспаление [2, 3]. Иммунокомпетентные клетки реагируют на протекающий в организме воспалительный процесс путем изменения степени экспрессии, появления или исчезновения поверхностных или внутриклеточных функциональных молекул [4].

В настоящее время иммунофенотипирование лейкоцитов имеет диагностическое значение при первичных и приобретенных иммунодефицитах и лимфопролиферативных заболеваниях, для которых четко сформулированы диагностические критерии и фенотипические особенности клеток. Исследование поверхностных маркеров лейкопитов классифицированными при заболеваниях, связанных иммунодефицитами или онкогематологией, не является диагностически значимым, однако позволяет оценивать патогенетические особенности воспалительного процесса, прогнозировать развитие патологии [4]. Для оценки особенностей воспалительного целесообразно ответа макроорганизма использовать расширенную

иммунофенотипических маркеров, включающих пул активированных клеток, экспрессию интегринов и маркеров пролиферации с использованием многоцветного цитофлюориметрического анализа [5, 6].

Цель: оценить иммунофенотипические показатели клеточного иммунного ответа у пациентов с различными этиологическими вариантами вторичной инфекции кожи и мягких тканей.

Материал методы. Объектом исследования были 105 пациентов (основная группа) с вторичными инфекциями кожи и мягких тканей, представленные длительнонезаживающими раневыми дефектами: трофическими язвами, пролежнями, ожогами, гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы, инфицированными посттравматическими ранами: ранами. которые сформировались предшествующих острых гнойных воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей ІІ уровня (некротической формы рожистого воспаления, флегмоны или абсцессов мягких тканей с некрозом кожи). Все раны относились к категории длительно-незаживающих (хронических ран), срок существования составлял от 4-х недель до 1 года. Пациенты были госпитализированы для оказания специализированной медицинской помощи в отделения хирургического профиля г. Гомеля. Локальная клиническая оценка раны осуществлялась с использованием системы MEASURE [7]. Для описания клинических признаков, характеризующих состояние и выраженность воспаления в ране, использовали систему оценки BWAT. Для определения уровня инфекционного процесса в ране (контаминация и колонизация, критическая колонизация, глубокая инфекция) использовали мнемосхемы STONEES и NERDS, а также разработанные в предыдущих исследованиях критерии [7-9].

На момент поступления в стационар у пациентов основной группы получали мазок из раны для проведения микробиологического исследования. В зависимости от результата посева пациентов основной группы разделили на 2 подгруппы. В подгруппу 1 (n=65) включили пациентов, из ран которых высевались представители грамположительной флоры, в том числе в виде ассоциаций. У пациентов подгруппы 2 (n=40) микрофлора ран была представлена монокультурами грамотрицательных бактерий, либо ассоциациями, в которых грамотрицательные бактерии преобладали в количественном отношении.

Контрольную группу составили 25 пациентов с доброкачественными новообразованиями покровных тканей (кератомы, фибромы, атеромы, липомы), которые проходили лечение по программе «хирургия одного дня». Выбор данной группы был обусловлен наличием чистой линейной послеоперационной раны, из которой по результатам микробиологического исследования не высевались микроорганизмы.

У всех пациентов выполняли взятие периферической венозной крови для проведения иммунофенотипирования. Дифференцировку лейкоцитов периферической крови по субпопуляциям (лимфоциты, гранулоциты, моноциты) осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе Cell-Dyn Sapphire (Abbott Laboratories, США). Для иммунофенотипирования лейкоцитов крови использовали метод лазерной 8-цветной проточной цитофлюориметрии на цитометре BD FACSCantoII (Becton Dickinson, США). Для идентификации Т-В-клеток и их субпопуляций, фагоцитов и натуральных киллеров (НК-клеток), определения маркеров активации клеток, рецепторов использовали моноклональные антитела, меченные фикоэритрином (РЕ), флуоресцинизотиоционатом (FITC), перидинин-хлорофилл протеином (Per-CP) алофикоцианином (APC), APC-Alexa Fluor 750, Pacific Blue (PB), Krome orange (KO).

Все лабораторные исследования выполняли в клинико-диагностической лаборатории и лаборатории клеточных технологий ГУ «Республиканский научнопрактический центр радиационной медицины и экологии человека».

В работе применены общепринятые графические методы выражения результатов с использованием встроенных графических модулей системы «STATISTICA 6.1» (StatSoft Inc., США регистрационный номер GS-35F-5899H). Распределение количественных признаков представлено методом описательной статистики в виде Ме – медиана и 25% – нижний квартиль, 75% – верхний квартиль. Для сравнения показателей независимых выборок использовался ранговый U-критерий Манн-Уитни. Для выявления корреляций выполнялся анализ по Спирмену. Различия считали значимыми при p<0,05.

Результаты и обсуждение. По результатам клинической оценки раны у пациентов основной группы наблюдались клинические признаки воспаления различной степени выраженности: рыхлые, легко кровоточащие, красного или бордового цвета грануляции, либо грануляции с признаками атрофии или рубцевания; гнойное или серознофибринозное отделяемое в скудном или умеренном количестве; отек и уплотнение мягких тканей вокруг раны, гиперемия окружающей кожи, повышение местной температуры; неприятный запах из раны.

Этиологическая структура выделенных из ран бактерий представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Этиологическая структура бактерий, выделенных из ран пациентов основной группы

Показатель	Π одгруппа 1 (n = 65)	Π одгруппа 2 (n = 40)
Монокультуры	<i>n (%)</i> 48 (74)	<i>n (%)</i> 12 (30)
Γ+	S. aureus, 35 (73)	НФБ, 8 (67)
Γ-	S. haemolyticus, 13 (27)	Enterobacteriaceae, 4 (33)
Ассоциации	17 (26)	28 (70)
Γ+/Γ+	S. aureus / S. haemolyticus+E. faecalis, 3 (17,6)	-
Γ-/Γ-	-	HФБ+ <i>Enterobacteriaceae</i> , 5 (18)
Γ+/Γ- Γ-/Γ+	S. aureus / S. haemolyticus+ Enterobacteriaceae / ΗΦБ 14 (82,4)	HФБ+E. faecalis / S. haemolyticus, 4 (14) HФБ+E. faecalis+Staphylococcus, 4 (14) HФБ+Enterobacteriaceae+E. faecalis, 8 (29) Enterobacteriaceae+E. faecalis, 3 (11) Enterobacteriacea+E. faecalis+Staphylococc us, 4 (14)
Всего штаммов	91	76
≥10 ⁵ КОЕ/мл	66 (72,5)	38 (50)
10 ³ -10 ⁴ КОЕ/мл	9 (10)	12 (16)
10 ¹ -10 ² КОЕ/мл	16 (17,5)	26 (34)

Примечания: НФБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии;

 Γ + – грамположительные бактерии; Γ - – грамотрицательные бактерии.

В подгруппе 1 монокультуры грамположительных бактерий были представлены S. aureus или S. haemolyticus, в составе ассоциаций стафилококки обнаруживались совместно с E. faecalis, энтеробактериями (K. pneumoniae, E. cloacae, E. coli), неферментирующими бактериями (P. aeruginosa, A. baumannii). В подгруппе 1 в целом был выделен 91 штамм бактерий, количество преимущественно составляло $\geq 10^5$ КОЕ/мл. В подгруппе 2 доминирующими бактериями были представители грамотрицательной флоры, которые высевались в составе монокультур или ассоциаций, в том числе с грамположительными бактериями. У пациентов подгруппы 2 по результатам посевов было обнаружено 76 штаммов, в половине случаев их количество составляло $\geq 10^5$ КОЕ/мл (таблица 1).

По результатам проведения проточной цитофлюориметрии у пациентов основной группы с вторичной инфекцией кожи и мягких тканей в сравнении с контрольной группой были выявлены различия в экспрессии фенотипических маркеров лейкоцитов крови (таблица 2).

Таблица 2. – Фенотипы лейкоцитов пациентов основной и контрольной групп и маркировка иммунологических показателей

Показатели/фенотип Практовка Срафсков			Основная группа	Контрольная	Значимость
CD3+CD3+ CD3+ CD3+ CD3+CD3+ CD3+CD3+ CD3+CD3+ CD3+CD3+ CD3+					различий по
Общее количество лейкопитов (x10 /мкл) 6,8 (5,7; 8,9) 6,1 (5,5; 6,4) Z-1,8; p=0,06 Относительное содержание лимфоцитов (x10 /мкл) 30,0 (23,0; 35,5) 29,7 (23,5; 34,0) Z=2; p=0,8 Коинчество Т-лимфоцитов (x10 /мкл) 0,2 (0,1; 0,3) 1,3 (1,0; 1,5) Z=0,2; p=0,8 Коинчество В-лимфоцитов (x10 /мкл) 0,2 (0,1; 0,3) 0,18 (0,13; 0,3) Z=0,2; p=0,8 Т-звено Т-звено Т-зимфоциты CD45+CD3+CD4+ Т-келперы/пиркторы 75,4 (69,4; 81,1) 70,5 (67,9; 74,7) Z=2,1; p=0,02 СФ45+CD3+CD8+ Т-интогоксические димфошиты 25,0 (19,8; 29,3) 26,8 (24,7; 28,4) Z=1,2; p=0,2 СФ5+СD3+CD3+ Т-регулиторные клетки 2,7 (2,0; 3,8) 2,7 (2,1; 3,9) Z=5,4; p<0,01	Показатели/фенотип	Трактовка	Me %	Me % (25%;	тесту Манн-
Облие количество лейкощитов (x10²/мкл) 6,8 (5,7; 8,9) 6,1 (5,5; 6,4) Z=1,8; p=0,06 Относительное содержание лимфощитов (x10²/мкл) 30,0 (23,0; 35,5) 29,7 (23,5; 34,0) Z=0,2; p=0,8 Количество В-лимфощитов (x10²/мкл) 1,4 (1,2; 1,6) 1,3 (1,0; 1,5) Z=0,2; p=0,8 Т-звено			(25%; 75%)	75%)	
Относительное содержание лимфошитов (х10 ½мкл) 30.0 (23.0; 35.5) 29.7 (23.5; 34.0) Z=0.2; p=0.8 Количество Т-лимфошитов (х10 ½мкл) 0.2 (0.1; 0.3) 0.18 (0.13; 0.3) Z=0.2; p=0.8 СОФ45 СОЗ+ Т-лимфошиты 75.4 (69.4; 81.1) 70.5 (67.9; 74.7) Z=2.1; p=0.03 СОФ45 СОЗ+ СОЗ+ СОЗ+ СОЗ+ СОЗ+ СОЗ+ СОЗ+ СОЗ+					
Количество Т-лимфоцитов (х10 ³ /мкл)			6,8 (5,7; 8,9)	6,1 (5,5; 6,4)	Z=1,8; p=0,06
Количество В-лимфонитов (х10³/мкл) 0,2 (0,1; 0,3) 0,18 (0,13; 0,3) Z=0,2;p=0,8 СD45+CD3+ Т-лимфониты 75,4 (69,4; 81,1) 70,5 (67,9; 74,7) Z=2,1; p=0,03 CD45+CD3+CD4+ Т-хелперы/индукторы 46,7 (39,1; 50,7) 44,0 (39,7; 48,0) Z=0,8; p=0,4 CD45+CD3+CD8+ Т-цитотоксические лимфониты 25,0 (19,8; 29,3) 26,8 (24,7; 28,4) Z=1,2; p=0,2 CD3+HLADR+ Поздний маркер активации и тах, связан с хроническим 5,4 (4,6; 7,9) 2,3 (2,0; 2,5) Z=5,4; p<0,01	Относительное содерж	ание лимфоцитов, %	30,0 (23,0; 35,5)	29,7 (23,5; 34,0)	
Т-звенов CD45+CD3+ Т-лимфоциты 75,4 (69,4; 81,1) 70,5 (67,9; 74,7) Z=2,1; p=0,03 CD45+CD3+CD4+ Т-келперы/индукторы 46,7 (39,1; 50,7) 44,0 (39,7; 48,0) Z=0,8; p=0,4 CD45+CD3+CD8+ Т-цитогоксические лимфоцитах 25,0 (19,8; 29,3) 26,8 (24,7; 28,4) Z=1,2; p=0,2 CD3+CD4+CD4+ Поздний маркер активации на Т-лимфоцитах, связан с хроническим воспалением 5,4 (4,6; 7,9) 2,3 (2,0; 2,5) Z=5,4; p<0,01	Количество Т-лимфоци	тов (х10 ³ /мкл)	1,4 (1,2; 1,6)	1,3 (1,0; 1,5)	Z=0,9; p=0,4
СD45+CD3+ Т-лимфоциты 75,4 (69,4; 81,1) 70,5 (67,9; 74,7) Z=2,1; p=0,03 CD45+CD3+CD4+ Т-хелперы/индукторы 46,7 (39,1; 50,7) 44,0 (39,7; 48,0) Z=0,8; p=0,4 CD45+CD3+CD8+ Т-инготоксические лимфошиты 25,0 (19,8; 29,3) 26,8 (24,7; 28,4) Z=1,2; p=0,2 CD3+HLADR+ Поддний маркер активации на Т-лимфошитах, связан с хроинческим воспалением 5,4 (4,6; 7,9) 2,3 (2,0; 2,5) Z=5,4; p<0,01	Количество В-лимфоци	тов (х10 ³ /мкл)	0,2 (0,1; 0,3)	0,18 (0,13; 0,3)	Z=0,2;p=0,8
CD45+CD3+CD4+ Т-хелтеры/индукторы 46,7 (39,1; 50,7) 44,0 (39,7; 48,0) Z=0,8; p=0,4 CD45+CD3+CD8+ Т-штогоксические дакимации на Тимофоцитах (связан с хроническим воспалением 25,0 (19,8; 29,3) 26,8 (24,7; 28,4) Z=1,2; p=0,2 CD3+HLADR+ Поздний маркер активации на Тимофоцитах (связан с хроническим воспалением 5,4 (4,6; 7,9) 2,3 (2,0; 2,5) Z=5,4; p<0,01					
CD45+CD3+CD8+ Т-щитотоксические лимфоциты 25,0 (19,8; 29,3) 26,8 (24,7; 28,4) Z=1,2; p=0,2 CD3+HLADR+ Поздний маркер активации на Т-лимфоцитах, связан с хроническим воспалением 5,4 (4,6; 7,9) 2,3 (2,0; 2,5) Z=5,4; p<0,01		1			
СD3+CD3+CD3+	CD45+CD3+CD4+	1 1	46,7 (39,1; 50,7)	44,0 (39,7; 48,0)	Z=0,8; p=0,4
Поздний маркер активации на Т- лимфоцитах, связан с хроническим воспалением СD3+CD4+CD25+ СD4+CD38+CD3+ СD4+CD38+CD3+ СD4+LADR+CD3+ СD4+CD28+ СD5+CD5+CD5+ СD8+CD5+ СD8+CD5+ СD8+CD5+ СD8+CD5+ СD8+CD5+ СD8+CD7+ СД8+СД8+ СД8+ СД8	CD45+CD3+CD8+		25.0 (19.8: 29.3)	26.8 (24.7: 28.4)	7=1.2·n=0.2
CD3+HLADR+ активации на Т- лимфоцитах, связан с хроническим воспалением 5,4 (4,6; 7,9) 2,3 (2,0; 2,5) Z=5,4; p<0,01	CD43+CD3+CD0+		23,0 (17,0, 27,3)	20,0 (24,7, 20,4)	Z 1,2, p 0,2
CD3+HLADR+ лимфоцитах, связан с хроническим воспалением 5,4 (4,6; 7,9) 2,3 (2,0; 2,5) Z=5,4; p<0,01					
СD3+CD4+CD25+ Т-регуляторные клетки 2,7 (2,0; 3,8) 2,7 (2,1; 3,9) Z=0,09; p=0,9 2,0 (2,0; 3,8) 2,7 (2,1; 3,9) Z=0,09; p=0,9 2,0 (2,0; 3,8) Z=1,9; p=0,04		·			
Воспалением 2,7 (2,0; 3,8) 2,7 (2,1; 3,9) Z=0,09; p=0,9	CD3+HLADR+		5,4 (4,6; 7,9)	2,3 (2,0; 2,5)	Z=5,4; p<0,01
CD3+CD4+CD25+ Т-регуляторные клетки 2,7 (2,0; 3,8) 2,7 (2,1; 3,9) Z=0,09; p=0,9 CD4+CD38+CD3+ Ранний маркер активации Т-хелперов 12,0 (6,3; 15,0) 21,5 (11,8; 24,0) Z=1,9; p=0,04 CD4+HLADR+CD3+ Поздний маркер активации, пролиферации и пролукции цитокинов на Т-хелперах 2,3 (1,5; 3,8) 2,0 (2,0; 2,5) Z=1,4; p=0,9 CD4+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления 40,1 (30,6; 44,9) 31,8 (30,0; 38,0) Z=1,4; p=0,1 CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфошитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01		•			
CD3+CD3+CD3+ CD3+CD3+ CD4+CD38+CD3+ Pahnuй маркер активации Т-хелперов CD4+HLADR+CD3+ CD4+HLADR+CD3+ CD4+CD28+ CD4+CD28+ CD8+CD38+CD3+ CD8+CD38+					
CD4+CD38+CD3+ Ранний маркер активации Т-хелперов (СD4+HLADR+CD3+) 12,0 (6,3; 15,0) 21,5 (11,8; 24,0) Z=1,9; p=0,04 CD4+HLADR+CD3+ Поздний маркер активации, пролиферации и пролукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления 40,1 (30,6; 44,9) 31,8 (30,0; 38,0) Z=1,4; p=0,9 CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01	CD3+CD4+CD25+		2.7 (2.0: 3.8)	2.7 (2.1: 3.9)	Z=0.09: p=0.9
СD4+CD38+CD3+ активации Т-хелперов 12,0 (6,3; 15,0) 21,3 (11,8; 24,0) Z=1,9, p=0,04 CD4+HLADR+CD3+ Поздний маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления 40,1 (30,6; 44,9) 31,8 (30,0; 38,0) Z=1,4; p=0,1 CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01			=,, (=,0,0,0)	=,, (=,1,0,2)	= 0,00, p 0,0
CD4+HLADR+CD3+ Поздний маркер активации на Т-хелперах 2,3 (1,5; 3,8) 2,0 (2,0; 2,5) Z=1,4; p=0,9 CD4+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления 40,1 (30,6; 44,9) 31,8 (30,0; 38,0) Z=1,4; p=0,1 CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01	CD4+CD38+CD3+		12,0 (6,3; 15,0)	21,5 (11,8; 24,0)	Z=1,9; p=0,04
CD4+HLADR+CD3+ активации на Т- хелперах 2,3 (1,5; 3,8) 2,0 (2,0; 2,5) Z=1,4; p=0,9 Mаркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления 40,1 (30,6; 44,9) 31,8 (30,0; 38,0) Z=1,4; p=0,1 CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01					
СD4+CD28+ Маркер активации и продукции цитокинов на Т-келтовсических лимфоцитах СD8+CD28+ СD8+CD28+ Поздний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах СD8+CD28+ CD8+CD28+ CD8	CD4+HLADR+CD3+		2 3 (1 5: 3 8)	2.0 (2.0: 2.5)	7=1 4· n=0 9
CD4+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления 40,1 (30,6; 44,9) 31,8 (30,0; 38,0) Z=1,4; p=0,1 CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01	CD4+IIL/IDIK+CD3+		2,3 (1,3, 3,6)	2,0 (2,0, 2,3)	Z 1,4, p 0,5
CD4+CD28+ пролиферации и продукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления 40,1 (30,6; 44,9) 31,8 (30,0; 38,0) Z=1,4; p=0,1 CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01					
СD4+CD28+ продукции цитокинов на Т-хелперах, маркер хронического воспаления СD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах СD8+HLADR+CD3+ Поздний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах СD8+CD28+ Поздний маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах СD8+CD28+ Поздний маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах СD8+CD28+ Поздний маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах Маркер активации Т-клеток, обусловленной присутствием провоспалительных Поздний маркер активации Т-клеток, обусловленной присутствием провоспалительных				31,8 (30,0; 38,0)	
СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+HLADR+CD3+ СD8+HLADR+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+CD3+ СD8+CD38+СD3+ СD8+CD38+ СД8+					
СD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т-цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01	CD4+CD28+		40,1 (30,6; 44,9)		Z=1,4; p=0,1
Воспаления Ранний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах Поздний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах Поздний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах Маркер активации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах Маркер активации Т- клеток, обусловленной присутствием провоспалительных Воспаления 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01 Z=1,5; p=0,1 17,5 (13,6; 23,0) 25,0 (17,3; 25,4) Z=1,4; p=0,1 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07					
CD8+CD38+CD3+ Ранний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01					
CD8+CD38+CD3+ активации на Т- цитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01 CD8+HLADR+CD3+ Поздний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах 3,4 (4,9; 2,7) 2,9 (2,0; 3,6) Z=1,5; p=0,1 CD8+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах 17,5 (13,6; 23,0) 25,0 (17,3; 25,4) Z=1,4; p=0,1 CD3+CD73+ Маркер активации Т- клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07					
CD8+CD38+CD3+ щитотоксических лимфоцитах 1,8 (1,2; 2,7) 13,2 (9,0; 20,0) Z=4,2; p<0,01	CD0 : CD20 : CD2 :		404445	12.2 (0.0.20.0)	7 4 2 +0.01
СD8+HLADR+CD3+	CD8+CD38+CD3+	'	1,8 (1,2; 2,7)	13,2 (9,0; 20,0)	Z=4,2; p<0,01
CD8+HLADR+CD3+ Поздний маркер активации на Т- цитотоксических лимфоцитах 3,4 (4,9; 2,7) 2,9 (2,0; 3,6) Z=1,5; p=0,1 CD8+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах 17,5 (13,6; 23,0) 25,0 (17,3; 25,4) Z=1,4; p=0,1 CD3+CD73+ Маркер активации Т- клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07					
CD8+HLADR+CD3+ активации на Т- цитотоксических лимфоцитах 3,4 (4,9; 2,7) 2,9 (2,0; 3,6) Z=1,5; p=0,1 CD8+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитоксических лимфоцитах 17,5 (13,6; 23,0) 25,0 (17,3; 25,4) Z=1,4; p=0,1 CD3+CD73+ Маркер активации Т- клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07					
СD8+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитоксических лимфоцитах Маркер активации, пролиферации и продукции цитоксических лимфоцитах Маркер активации Т-клеток, обусловленной присутствием провоспалительных Тийтотоксических димородитах провоспалительных провоспалител	CD0+III ADD+CD2+		2.4.(4.0. 2.7)	20(20.20	7 1 5 0 1
СD8+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах Маркер активации Т-клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07	CD8+HLADR+CD3+		3,4 (4,9; 2,7)	2,9 (2,0; 3,6)	Z=1,5; p=0,1
СD8+CD28+ Маркер активации, пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах Маркер активации Т-клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07		лимфоцитах			
СD8+CD28+ пролиферации и продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах					
СD8+CD28+ продукции цитокинов на Т-цитотоксических лимфоцитах					
лимфоцитах Маркер активации Т-клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07	CD8+CD28+	продукции цитокинов	17,5 (13,6; 23,0)	25,0 (17,3; 25,4)	Z=1,4; p=0,1
СD3+CD73+ Маркер активации Т-клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07		на Т-цитотоксических			
СD3+CD73+ Клеток, обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07		лимфоцитах			
CD3+CD73+ обусловленной присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07	_	Маркер активации Т-			
Присутствием провоспалительных 10,2 (5,9; 12,2) 6,3 (3,2; 9,5) Z=1,8; p=0,07		клеток,			
провоспалительных	CD3+CD72+	обусловленной	10.2 (5.0.12.2)	63 (2 2: 0.5)	7=1 8: n=0.07
	CD3+CD/3T	присутствием	10,4 (3,7, 14,4)	6,3 (3,2; 9,5)	∠-1,0, p-0,0/
цитокинов		провоспалительных			
		цитокинов			

			Продолже	ние таблицы 2
CD3+CD38+	Общий маркер	18,5 (12,2; 23,1)	21,3 (14,4; 34,2)	Z=1,2; p=0,2
CD3+CD30+	активации Т-клеток	10,3 (12,2, 23,1)	21,3 (11,1,31,2)	2 1,2, p 0,2
ИРИ	Иммунорегуляторный индекс	1,9 (1,4; 2,4)	1,7 (1,4; 1,8)	Z=1,2; p=0,3
		В-звено		
CD19+	В-лимфоциты	11,4 (8,2; 14,9)	12,7 (10,1; 15,5)	Z=1,3; p=0,2
CD19+HLADR+	Экспрессия HLA-DR на В-лимфоцитах, поздний маркер активации	9,5 (3,5; 14,2)	10,9 (10,1; 12,0)	Z=2,7; p=0,006
	ŀ	Силлеры	1	
CD3-CD16+CD56+	Натуральные киллеры (НК)- цитотоксические	10,3 (6,8; 14,7)	16,8 (13,1; 19,2)	Z=2,7; p=0,006
CD3-CD8+	НК-цитотоксические с экспрессией CD8	2,6 (1,6; 3,5)	2,5 (1,8; 3,7)	Z=0,1; p=0,9
CD3+CD16+CD56+	Натуральные киллеры Т-зависимые (Т-НК), маркер воспаления	1,9 (1,0; 4,9)	1,0 (0,6; 1,7)	Z=1,8; p=0,06
	1 1	ецепторы, фагоцит	ы	
CD11an	Интегрин, обеспечивает адгезию нейтрофилов к сосудистому эндотелию	6,7 (15,6; 9,5)	86,1 (77,8; 91,5)	Z=5,0; p<0,01
CD11alym	Экспрессия интегрина на лимфоцитах	68,7 (60,9; 79,8)	79,4 (69,3; 87,3)	Z=1,3; p=0,2
CD11bCD3	Экспрессия интегрина на Т-лимфоцитах	29,3 (23,8; 32,4)	63,1 (54,2; 75,0)	Z=3,6; p<0,01
CD11bn	Экспрессия интегрина на нейтрофилах	99,7 (99,4; 99,9)	99,8 (98,9; 99,8)	Z=0,2; p=0,8
CD11cn	Интегрин, маркер адгезии нейтрофилов к эндотелию и индукции их активации	85,8 (29,5; 97,3)	99,3 (98,9; 99,7)	Z=4,3; p<0,01
CD18+n	β2-субъединица интегринов (адгезин) на нейтрофилах	99,8 (99,6; 99,9)	99,7 (99,5; 99,9)	Z=0,2; p=0,8
CD15+n	Маркер нейтрофилов. Сигнальная молекула для инициации воспалительной реакции при контакте нейтрофилов с эндотелием	98,0 (94,2; 99,5)	97,1 (94,5; 99,5)	Z=0,3; p=0,7
CD71m	Рецептор к трансферрину – Маркер пролиферации на моноцитах	4,9 (2,7; 6,7)	17,0 (14,0; 19,0)	Z=3,0; p<0,01
CD71n	Маркер пролиферации на нейтрофилах	2,5 (1,35; 4,6)	17,9 (15,0; 19,5)	Z=3,0; p<0,01

Продолжение таблицы 2				
CD71lym	Маркер пролиферации на лимфоцитах	2,9 (1,8; 5,8)	7,8 (5,2; 10,1)	Z=2,0; p=0,04
CD66bn	Специфический регулятор активации и адгезии нейтрофилов посредством CD11/CD18	99,8 (99,6; 100)	99,8 (99,8; 100,0)	Z=1,0; p=0,3

Учитывая выявленные различия, выполнен сравнительный анализ иммунофенотипических показателей крови пациентов основной группы в зависимости от этиологического варианта инфекции. В отношении относительных показателей CD19+HLADR+ и CD11cn, для которых ранее был выявлен значительный разброс результатов (таблица 1), установлены значимые различия. В подгруппе 1, в которой этиологическая структура инфекции раны была представлена грамположительной микрофлорой, показатели CD19+HLADR+ и CD11cn были выше: 13,2 % (9; 16) и 95,5 % (83,4; 98), соответственно. В подгруппе 2, в которой преобладающими в количественном отношении были грамположительные бактерии, степень экспрессии CD19+HLADR+ и CD11cn составляла 1,9 % (1,1; 6) и 23,6 % (14,5; 32,1) соответственно (р<0,01) (рисунок).

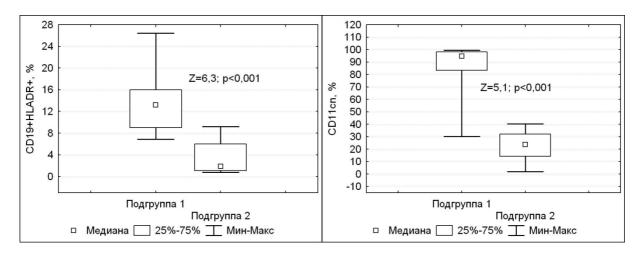


Рисунок – Различия в степени экспрессии иммунофенотипических маркеров CD19+HLADR+ и CD11cn у пациентов подгрупп 1 и 2

Выводы:

- 1. Вторичные инфекции кожи и мягких тканей, представленные длительнонезаживающими раневыми дефектами различной этиологии, сопровождаются изменениями иммунологической реактивности в виде повышения относительного содержания Т-лимфоцитов и снижения НК-клеток, низкого уровня экспрессии ранних маркеров активации на Т-хелперах и Т-цитотоксических лимфоцитах (CD4+CD38+CD3+ и CD8+CD38+CD3+) и HLADR на В-лимфоцитах, высоким уровнем экспрессии поздних маркеров активации Т-клеток (CD3+HLADR+).
- 2. В условиях раневого процесса, протекающего в чистой линейной послеоперационной ране, степень экспрессии полифункциональных молекул миграции, адгезии, фагоцитоза интегринов (CD11a, CD11b, CD11c), а также рецептора к трансферрину (CD71) на поверхности нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов,

отражающего активность клеточной пролиферации, значительно выше, чем при длительно-незаживающих инфицированных ранах.

3. Инфекция раны, вызванная грамположительной флорой (*S. aureus* или *S. haemolyticus*), сопровождается более высокими показателями CD19+HLADR+ и экспрессии CD11с на нейтрофилах, чем при инфекции, где в количественном отношении преобладают грамположительные бактерии (неферментирующие бактерии, энтеробактерии).

Литература

- 1. Особенности изменения иммунного статуса при гнойно-воспалительных заболеваниях / М.А. Земсков [и др.] // Вест. эксперимент. клинич. хирургии. 2011. № 3. С. 468-472.
- 2. Предоперационная медикаментозная коррекция системной реакции организма на операционную травму у больных хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей / С.М. Смотрин [и др.] // Новости хирургии. 2009. Т. 17, № 1. С. 47-54.
- 3. Biofilms and inflammation in chronic wounds / G. Zhao [et al.] // Adv. Wound Care (New Rochelle). 2013. Vol. 2, No. 7. P. 389-399.
- 4. Пичугина, Л.В. Изменение фенотипа лимфоцитов при неиммунодефицитных патологиях / Л.В. Пичугина // Лабораторная медицина. 2008. № 9. С. 39-47.
- 5. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков [и др.] // Медицинская иммунология. -2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238.
- 6. Хайдуков, С.В. Современные подходы к оценке фенотипа различных субпопуляций лимфоцитов / С.В. Хайдуков // Лабораторная медицина. 2013. № 12. С. 65-76.
- 7. Sibbald, G.R. Increased bacterial burden and infection: NERDS and STONEES / G.R. Sibbald, K.Y. Woo, E. Ayello // Wounds UK. 2007. Vol. 3, No. 2. P. 25-46.
- 8. MEASURE: A proposed assessment framework for developing best practice recommendations for wound assessment / D.H. Keast [et al] // Wound Repair Regen. -2004. Vol. 12, suppl s1. P. 1-17.
- 9. Yarets, Y. Effective biofilm removal and changes in bacterial biofilm building capacity after wound debridement with low-frequency ultrasound as part of wound bed preparation before skin grafting / Y. Yarets // Chronic Wound Care Manag. Res. 2017. Vol. 4. P. 55-64.
- 10. Swab versus biopsy for the diagnosis of chronic infected wounds / A.A. Rondas [et al.] // Adv. Skin Wound Care. 2013. Vol. 26. P. 211-219.

CONDITION OF IMMUNOPHENOTYPIC MARKERS OF CELLULAR IMMUNE RESPONSE WITH DIFFERENT ETIOLOGICAL VARIANTS OF SECONDARY INFECTION OF SKIN AND SOFT TISSUES

Y. Yarets

Republican Scientific Center for Radiation Medicine & Human Ecology, Gomel, Belarus

The results obtained on clinical, microbiological and immunological examination of 105 patients with secondary infections of the skin and soft tissues represented by chronic wounds of various origins and duration. Comparison of indicators was performed relative to the group of patients (n=25) with uninfected linear postoperative wounds. An increase in the relative content of T-cells, NK-cells, a decrease in CD4+CD38+CD3+ and CD8+ CD38+CD3+, CD19+HLADR+, CD11a, CD11b, CD11c, CD71, and an increase in CD3+HLADR+ was detected at the patients with wound infection. With a gram-positive infection, the expression level of CD19+HLADR+ and CD11c on neutrophils was significantly higher than with gramnegative infection.

Keywords: secondary infections of the skin and soft tissues, chronic wounds, leukocyte immunophenotyping, multicolor flow cytofluorimetry, associative microflora.

Поступила 03.12.2018

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

Правила для авторов

- 1. Статьи должны быть написаны на высоком научном и методическом уровне с учетом требований международных номенклатур, отражать актуальные проблемы инфекционной патологии человека, содержать новую научную информацию, рекомендации практического характера.
- 2. Статья должна быть напечатана на одной стороне листа с одинарным межстрочным интервалом в 1-м экземпляре. Для всего текста публикации использовать шрифт Times New Roman размером 12 пунктов, абзацный отступ (красная строка) 1 см, с выравниванием по ширине, межстрочный интервал одинарный, без установки автоматического переноса, все поля по 25 мм.
- 3. Объем статьи, включая рисунки, таблицы, библиографический список литературы 5-7 страниц формата А4, научных обзоров до 12 страниц.
- 4. Статья должна быть изложена на русском или английском языке для иностранных авторов.
- 5. Заглавие статьи печатается с выравниванием по центру без точек в конце и включает.

1) НАЗВАНИЕ СТАТЬИ – ПЕЧАТАЕТСЯ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ БЕЗ СОКРАЩЕНИЙ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ

- 2) инициалы и фамилии авторов указываются ниже строчными буквами курсивом жирным шрифтом
- 3) полное название учреждения, город, страна указываются на следующей строке строчными буквами курсивом нежирным шрифтом.
- 6. После заглавия (на языке текста публикуемого материала) приводится резюме. Текст резюме должен содержать краткую информацию (до 10 строк) о результатах публикуемой работы, отражать, что нового несет в себе работа в сравнении с другими известными по тематике публикациями. После рзюме печатаются ключевые слова (не более 5).
- 7. Текст статьи печатается с обязательным выделением следующих разделов: введение, содержащее краткий обзор литературы по данной проблеме, с указанием нерешенных ранее вопросов, сформулированную и обоснованную цель работы; основная часть: материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение или выводы; библиографический список (литература). В разделе «материалы и методы» обязательно сообщать о соблюдении правил работ с использованием экспериментальных животных (для экспериментальных исследований), а также указать использованные методы статистической обработки данных.
- 8. Сокращение слов не допускается, кроме общепринятых сокращений химических и математических величин, мер, терминов. В статьях должна быть использована система елинип СИ.
- 9. Таблицы, графики и диаграммы должны быть тщательно выверены автором и соответствовать цифрам в тексте и располагаться после их первого упоминания. Все таблицы, графики и диаграммы должны иметь названия. Оформление таблиц, графиков и диаграмм должно соответствовать требованиям ВАК Республики Беларусь. Каждая таблица должна иметь краткий заголовок, который состоит из слова «Таблица», ее порядкового номера и наименования, отделенного от номера точкой и знаком тире. Заголовок следует помещать над таблицей слева, без абзацного отступа.

- 10. Иллюстрации (фотографии, графики, рисунки, схемы) должны быть высокого качества и выполнены в цветах, хорошо различимых при черно-белой печати. Количество графического материала должно быть минимальным и пронумеровано последовательно арабскими цифрами. В подписях к микрофотографиям указываются увеличение (окуляр, объектив) и метод окраски материала. Графики, выполненные в табличном редакторе Excel, должны быть внедрены в документ с возможностью их дальнейшего редактирования, не следует удалять из файла Excel страницы с исходными данными для графика. Графики должны быть выполнены на белом фоне. Иллюстрации должны иметь наименование и пояснительные данные (подрисуночный текст), располагаемые по центру страницы. Пояснительные данные помещают под иллюстрацией, а со следующей строки – слово «Рисунок», номер и наименование иллюстрации, отделяя знаком тире номер от наименования. В конце нумерации иллюстраций ставится точка, в конце их наименований точка не ставится. Не допускается перенос слов в наименовании рисунка. Слово «Рисунок», его номер и наименование иллюстрации, печатаются полужирным шрифтом. Использование страниц альбомного формата не допускается.
- 11. В конце каждой оригинальной статьи должен быть приложен библиографический список литературы (не более 10), оформленный в соответствии с ГОСТ 7.1.-2003 «Библиографическое описание документа», для обзорной статьи (не более 25), ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте и приводятся в квадратных скобках (например: [1] или [1-3, 6]).
- 12. После «библиографического списка» печатается название статьи, фамилии авторов, название учреждения с указанием города и страны, реферат (100-150 слов) и ключевые слова на английском языке (если статья англоязычная, реферат приводится на русском языке). Буквального соответствия русского и английского рефератов не требуется.
 - 13. В конце статьи должны быть подписи всех авторов.
- 14. К статье прилагаются сведения об авторах (Ф.И.О., звание, ученая степень, должность, учреждение, город, адрес электронной почты и контактный телефон).
- 15. Обязательно предоставление материалов в электронном виде с соблюдением вышеуказанных правил. Файл должен иметь формат MS Word (*.DOC, *.RTF). Название файла должно содержать фамилию и инициалы первого автора и первые два слова названия статьи на русском языке (например, Сидров ИИ_Способ получения.doc).
- 16. Статья должна быть тщательно отредактирована и выверена автором. Обязательна виза руководителя подразделения. К статье прилагается экспертное заключение о возможности опубликования в открытой печати, и письмо-ходатайство организации, в которой выполнялась работа с обязательным указанием, что направляемые материалы ранее не были опубликованы или не приняты к печати другими изданиями (авторы несут за это полную ответственность).
- 17. Один автор имеет право на публикацию не более трех научных статей с учетом соавторства.
- 18. Лицам, осуществляющим послевузовское обучение (аспирантура, докторантура, соискательство) в год завершения обучения предоставляется первоочередная возможность опубликования представленных статей.
- 19. Поступившие в редакцию статьи направляются на рецензирование профильным специалистам. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи. Если по рекомендации рецензента статья возвращается на доработку, то переработанная рукопись вновь рассматривается редакционной коллегией, при этом датой поступления считается день получения редакцией ее окончательного варианта.

- 20. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи без искажения основного содержания статьи.
- 21. При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются. Рукописи не возвращаются.

Плата за опубликование научных статей не взимается со всех авторов.

Адрес и контактная информация редакции:

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, ул. Филимонова, 23, г. Минск, 220114, Республика Беларусь

Телефоны: (+375-17) 263 64 68; 237 69 79

Факс: (+375-17) 267 30 93

Электронная почта: rrpcem@belriem.by или belriem@gmail.com

http://www.belriem.by

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные сообщения З РЕАЛИЗАЦИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ Лешкевич А.Л., Морозик Л.А., Бурдейная Т.В., Пашкович В.В. 3 Оригинальные исследования 6 ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВИРУСНЫМ ГАСТРОЭНТЕРИТОМ В ЗАКРЫТЫХ КОЛЛЕКТИВАХ Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Лозюк С.К., Пилат П.И., Рыбин И.А. 6 ПРИВИВОЧНЫЙ СТАТУС И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ У РАБОТНИКОВ ОРГАНИЗАЦИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2016-2017 гг. Волченко А.Н., Мицура В.М., Запольская В.В., Терешков Д.В., Высоцкая В.С., Пашкович В.В., Глинская И.Н. 14 ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В СРЕДИ НАСЕДЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ Высоцкая В.С., Волченко А.Н., Коломиец И.Д. 19 ЛАБОРАТОРНАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ КОРИ И КРАСНУХИ У ПАЦИЕНТОВ 25 О МЕРАХ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО 25 О МЕРАХ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО 4 НАДЗОРА ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ 4 НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ 4 Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н. 31 ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА КРАСНУХИ ДЛЯ ДОКУМЕНТИРОВАНИЯ 6
РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ Лешкевич А.Л., Морозик Л.А., Бурдейная Т.В., Пашкович В.В
Оригинальные исследования
ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВИРУСНЫМ ГАСТРОЭНТЕРИТОМ В ЗАКРЫТЫХ КОЛЛЕКТИВАХ Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Лозюк С.К., Пилат П.И., Рыбин И.А
ГАСТРОЭНТЕРИТОМ В ЗАКРЫТЫХ КОЛЛЕКТИВАХ Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Лозюк С.К., Пилат П.И., Рыбин И.А
ПРИВИВОЧНЫЙ СТАТУС И ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ У РАБОТНИКОВ ОРГАНИЗАЦИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2016-2017 гг. Волченко А.Н., Мицура В.М., Запольская В.В., Терешков Д.В., Высоцкая В.С., Пашкович В.В., Глинская И.Н
ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ У РАБОТНИКОВ ОРГАНИЗАЦИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2016-2017 гг. Волченко А.Н., Мицура В.М., Запольская В.В., Терешков Д.В., Высоцкая В.С., Пашкович В.В., Глинская И.Н
Волченко А.Н., Мицура В.М., Запольская В.В., Терешков Д.В., Высоцкая В.С., Пашкович В.В., Глинская И.Н
Высоцкая В.С., Пашкович В.В., Глинская И.Н
ГЕПАТИТА В СРЕДИ НАСЕДЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ Высоцкая В.С., Волченко А.Н., Коломиец Н.Д. 19 ЛАБОРАТОРНАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ КОРИ И КРАСНУХИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛИХОРАДКОЙ И СЫПЬЮ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2018 г. Ермолович М.А., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю. 25 О МЕРАХ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н. 31 ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА КРАСНУХИ ДЛЯ ДОКУМЕНТИРОВАНИЯ ПРОГРЕССА В ВЫПОЛНЕНИИ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КРАСНУХИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Высоцкая В.С., Волченко А.Н., Коломиец Н.Д
С ЛИХОРАДКОЙ И СЫПЬЮ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2018 г. Ермолович М.А., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю
Ермолович М.А., Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю
НАДЗОРА ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н
НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н
Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В., Глебко Л.В., Рудая Л.Н. 31 ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА КРАСНУХИ ДЛЯ ДОКУМЕНТИРОВАНИЯ ПРОГРЕССА В ВЫПОЛНЕНИИ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КРАСНУХИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
ПРОГРЕССА В ВЫПОЛНЕНИИ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КРАСНУХИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
КРАСНУХИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю
КРОВОСОСУЩИЕ ЧЛЕНИСТОНОГИЕ – ПЕРЕНОСЧИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ИНВАЗИЙ НА ТЕРРИТОРИИ БЕРЕЗИНСКОГО БИОСФЕРНОГО ЗАПОВЕДНИКА (БЕЛАРУСЬ)
Сусло Д.С., Якович М.М., Бычкова Е.И., Волкова Т.В., Рустамова Л.М.,
Красько А.Г., Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Князева О.Р., Залевская О.С., Шипуль В.Н., Колтунова Ю.Б., Старинская Т.С.,

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ И АНТРОПУРГИЧЕСКИХ ОЧАГОВ ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ И ИЕРСИНИОЗОВ, НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ Счеслёнок Е.П., Семижон П.А., Фомина Е.Г., Бурдейко Е.Ю., Дубков Н.А., Владыко А.С., Федорович Е.В., Бусел С.А., Автухова Н.Л., Якусевич Т.В., Омельянович О.Г., Науменко Т.В., Овеснова Н.В., Селькина Е.С	3
МИКРОБИОЛОГИЯ55	
Обзорные сообщения	
ТРИПСИНПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПЕРИОДОНТИТА Ткачев С.В., Дедова Л.Н., Городецкая О.С., Семижон П.А	
Оригинальные исследования	
ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЦЕРКАРИОЗНЫМИ АЛЛЕРГОДЕРМАТИТАМИ В НАРОЧАНСКОЙ КУРОРТНОЙ ЗОНЕ Галенчик А.В., Швайко Т.П., Яшкова С.Е., Акимова Л.Н	
АСПЕКТЫ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ИНФЕКЦИЙ ВЫЗВАННЫХ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> В ОТДЕЛЕНИИ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ <i>Земко В.Ю., Окулич В.К., Дзядзько А.М.</i>	
МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА <i>ОМРА</i> БЕЛОРУССКИХ ИЗОЛЯТОВ <i>СНLAMYDIA TRACHOMATIS</i> Капустина Ю.М., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н	
АНАЛИЗ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЯСА ПТИЦЫ МЕХАНИЧЕСКОЙ ОБВАЛКИ Козельцева Е.И., Лобазова И.Е	
ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> У ЛИЦ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА <i>Рубаник Л.В., Мельник П.С., Полещук Н.Н.</i>	
ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ И МАЛАЦЕЗИЙ В СОСКОБАХ КОЖИ Руденкова Т.В. Костюк С.А. Шиманская И.Г. Милькото Н.А. 87	

вирусология	94
Оригинальные исследования	94
ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ КАК АКТУАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ И КЛЕТОК	
Амвросьева Т.В., Богуш З.Ф., Кишкурно Е.П., Поклонская Н.В., Аринович А.С., Байко С.В	94
ПАРЭХОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Шилова Ю.А	106
СЕРОСТАТУС ПАЦИЕНТОВ ИЗ ГРУПП РИСКА В ОТНОШЕНИИ	
ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ Амвросьева Т.В., Колтунова Ю.Б., Кишкурно Е.П., Долголикова А.А., Рубаник Л.В., Богуш З.Ф	112
ГЕРПЕСВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА 6, 7 ТИПОВ И ИХ АССОЦИАЦИЯ С	113
НЕВРОЛОГИЧЕСКОЙ И ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ Орлова С.В., Штыров А.А., Стома И.О., Карпов И.А	118
ВЫЯВЛЕНИЕ РНК ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА В КРОВОСОСУЩИХ КОМАРАХ, СОБРАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР	
Самойлова Т.И., Красько А.Г., Яшкова С.Е., Рустамова Л.М., Залевская О.С., Шипуль В.Н., Климович О.В., Дракина С.А., Цвирко Л.С.	124
ЗАРАЖЕННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ТЕРРИТОРИИ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ.	
Самойлова Т.И., Яшкова С.Е., Красько А.Г., Рустамова Л.М., Шипуль В.Н., Залевская О.С., Климович О.В., Дракина С.А., Цвирко Л.С., Сеньковец Т.А	. 128
ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РОТАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕГИОНАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2017-2018 гг.	
Семейко Г.В., Ухова И.Ф., Полякова Н.В., Ермолович М.А., Самойлович Е.О., Борисевич С.И., Горидовец Т.М., Думова С.А., Стасюкевич А.К.,	
Цеханович Н.С., Колосюк Н.В., Клюйко Н.Л., Лосева Е.М	131
СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НСV-ИНФЕКЦИИ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ Сергеева Т.А., Максименок Е.В., Ватаманюк М.Ю., Шагинян В.Р	136
ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ЗАЩИТНОГО УРОВНЯ АНТИТЕЛ К HBsAg У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ И СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА	
Терешков Д.В., Мицура В.М., Воропаев Е.В., Осипкина О.В., Голубых Н.М	141

ИММУНОЛОГИЯ148	8
Оригинальные исследования	8
ИЗМЕНЕНИЯ В АХИТЕТОНИКЕ АСТРОЦИТОВ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ IN VITRO АМИЛОИДНЫМИ β-ПЕПТИДАМИ, ФОРМИРУЮЩИМИСЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА Асташонок А.Н., Квачева З.Б., Полещук Н.Н	8
ДЕТЕКЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ОРГАНОВ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ Гончаров А.Е., Тимохина О.В., Прохоров А.В., Романовская С.Э., Колошко Л.Р 154	
ВЛИЯНИЕ ГРИБОВ РОДА <i>GANODERMA, LENTINULA, BOLETUS</i> НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА <i>Дуж Е.В., Гончаров А.Е.</i>)
РАСШИРЕННАЯ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА В- ЛИМФОЦИТАРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА Дуж Е.В., Гончаров А.Е	5
ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО ГЕРПЕСА У ВЗРОСЛЫХ Романива О.А	
ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА НА АНТИБИОТИКИ ИЗ ГРУПП БЕТА-ЛАКТАМОВ И ФТОРХИНОЛОНОВ Романова И.В., Гончаров А.Е., Чалей Е.И	
ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ, ПЕРЕНЕОСИМОСТИ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ И ГОРТАНИ Чекан В.Л., Стринкевич Э.А., Антоневич Н.Г., Гончаров А.Е	•
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТРАТЕКАЛЬНОГО СИНТЕЗА АНТИТЕЛ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПОРАЖЕНИЙ ЦНС Шагинян В.Р., Фильчаков И.В., Парфенюк Ю.В., Дьяченко П.А., Руденко А.А., Борщов С.П., Березина Л.В., Панасюк Е.Л	
ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЛЕЙКОЦИТОВ В ОЦЕНКЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ВТОРИЧНОЙ ИНФЕКЦИИ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ Ярец Ю.И	
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	

Научное издание

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов Основан в 2008 году Выпуск 11

Главный редактор: чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. *Л.П. Титов*

Ответственный редактор: д-р мед. наук, проф. *А.С. Владыко*

Редакторы: Е.С. Носоова, Т.А. Аблова

Компьютерная верстка: Т.А. Аблова, А.А. Ничипорук

Режим доступа: http://belriem.by/about/publications/sbornik-nauchnykh-trudov

Минимальные системные требования:
PC не ниже класса Pentium II;
32 Mb RAM; свободное место на HDD 16 Mb;
Adobe Reader;
Дисковод DVD-ROM