

**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 10

Минск
2017

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. В публикациях отражены актуальные вопросы эпидемиологического надзора и молекулярной эпидемиологии, молекулярно-генетических и клеточных механизмов патогенеза, современных проблем иммунопрофилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний.

Сборник предназначен для научных сотрудников и работников 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.-корр. 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. редактора),

В.А. Горбунов, канд. мед. наук, доц.,

В.Ф. Ерёмин, д-р мед. наук, проф.,

Н.Н. Полеицук, д-р мед. наук, проф.,

Т.И. Самойлова, д-р биол. наук, доц.,

Е.О. Самойлович, д-р мед. наук, доц.,

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, чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед.
наук, проф. (Беларусь),

Д. Феби, проф. (Великобритания),

М.В. Цыркунов, д-р мед. наук, проф. (Беларусь)

Рецензенты:

чл.-корр. НАН Беларуси, д-р биол. наук *Э.И. Коломиец*

д-р мед. наук, проф. *Н.Д. Коломиец*

НАУЧНО-ИННОВАЦИОННАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СЛЕЖЕНИЯ ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

*В.А. Горбунов¹, А.М. Дронина¹, Е.С. Носова¹, А.С. Петкевич¹, И.А. Карабан²,
Ю.Е. Федоров², В.А. Филонюк², Н.П. Жукова²*

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

² Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) Министерства здравоохранения Республики Беларусь (далее — Центр) является ведущим центром в стране, где выполняется широкий спектр научно-исследовательских работ фундаментального и прикладного характера в области эпидемиологии, медицинской вирусологии, микробиологии, иммунологии и паразитологии. Первостепенной задачей Центр ставит перед собой обеспечение и совершенствование эпидемиологического надзора и молекулярно-биологического мониторинга за актуальными имеющими медико-социальную значимость инфекционными заболеваниями.

В 2016 г. была сформирована новая подпрограмма «Инфекции и биологическая безопасность» (Подпрограмма), выполняющаяся в рамках Государственной научно-технической программы «Новые методы оказания медицинской помощи» (2016–2020 гг.). РНПЦ эпидемиологии и микробиологии является головной организацией-исполнителем Подпрограммы. Ее целью является научно-техническое обеспечение эпидемиологического надзора, направленного на предупреждение возникновения и распространения инфекционных заболеваний, борьбу с устойчивостью к противомикробным средствам, и укрепление национальной биологической безопасности путем разработки и внедрения в практическое здравоохранение передовых технологий, методов и средств профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных заболеваний в Республике Беларусь.

В 2017 г. в рамках Подпрограммы выполняется 27 заданий в следующих направлениях: нормативно-методическое и технологическое обеспечение эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями, устойчивостью к противомикробным лекарственным средствам и системы биологической безопасности (6 заданий); изделия медицинского назначения (ИМН) для диагностики инфекционных и иммунных заболеваний на основе использования геномных, протеомных и биоинформационных технологий (11 заданий); современные методы, средства и подходы к профилактике и этиопатогенетической (химио- и иммуно-) терапии инфекционных и иммунных заболеваний (9 заданий); научно-организационное сопровождение подпрограммы (1 задание). В 2017 г. Центр выполняет 44 задания НИР в рамках 11 научных и научно-технических программ.

Новые знания, полученные при проведении фундаментальных исследований в области эпидемиологии и микробиологии, проходя стадии прикладных исследований и разработок, находят применение в лабораторной диагностике. Одним из важных направлений деятельности Центра является научная разработка, создание и совершенствование диагностических средств, внедрение отечественной продукции в практику здравоохранения. Разработаны и внедрены в здравоохранение ПЦР, иммуноферментные и иммунофлуоресцентные диагностические тест-системы,

питательные среды, новые линии культур клеток, наборы для санитарной вирусологии и паразитологии.

Постоянно расширяется и обновляется номенклатура выпускаемых изделий. В 2016 г. разработаны и получены разрешения на серийный выпуск 16-ти новых ИМН для диагностики парвовирусной, герпесвирусной, респираторно-синцитиальной, аденовирусной инфекций, гриппа и парагриппа, индикации возбудителей бактериальных острых кишечных инфекций и инфекций, передаваемых клещами, генотипирования и выявления мутаций резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам, генодиагностики.

Разработка и внедрение в практику здравоохранения новых диагностических средств, позволяют обеспечивать потребности страны и поставки продукции на экспорт. В настоящее время разработанные ИМН обеспечивают около 30 % используемого перечня диагностических изделий в стране.

За последние пять лет Центр увеличил перечень выпускаемых диагностических и иммунобиологических препаратов для клинической медицины, диагностики инфекционных заболеваний до 150 наименований. Налажено производство наиболее востребованных в лабораторной диагностике тест-систем. Наиболее значимыми для практического здравоохранения являются наборы для диагностики кишечных инфекций и средства для индикации вирусной контаминации объектов окружающей среды, диагностики парентеральных вирусных инфекций (гепатиты и ВИЧ). Большим спросом пользуются мультиплексные наборы для выявления генетического материала респираторных вирусов методом ПЦР в режиме реального времени и дифференциальной диагностики ОРВИ, имеющие важное социально-экономическое значение. Перспективными диагностическими средствами являются наборы для серологической диагностики природно-очаговых инфекций и выявления специфических иммуноглобулинов к вирусу геморрагической лихорадки с почечным синдромом, которые позволяют проводить лабораторную диагностику в максимально короткое время на ранних стадиях, а также для диагностики особо опасных инфекций путем выявления суммарных антител.

Ряд разработанных препаратов ориентирован на экспорт. Объемы экспортируемой продукции каждый год увеличивается примерно на 10 %. В Российскую Федерацию экспортированы ИМН по 6-ти наименованиям (тест-система «ИФА-РОТА-АГ», тест-система «Белар-ГЛПС-АТ», тест-система «Белар-ГЛПС-АТ/IgM», набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды в системе децентрализованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, поверхностных и сточных вод, набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства).

В последнее время молекулярные методы, основанные на обнаружении нуклеиновых кислот возбудителей вирусных и бактериальных заболеваний, становятся все более важными в лабораторной диагностике. В 2016 году Центр разработал и выпустил на рынок 9 новых наборов для ПЦР-диагностики кишечных инфекций (для выявления ДНК норовирусов II геногруппы, энтеровирусов, возбудителей иерсиноозов), острых респираторных вирусных инфекций (для выявления генетического материала возбудителей тяжелых острых респираторных инфекций — вируса гриппа А субтипов H5, H7, H9 и коронавируса *MERS-CoV*), для индикации *H. pylori* в материале для исследования и идентификации мутаций в гене 23S рРНК, связанных с лекарственной устойчивостью к кларитромицину, инфекций передающихся половым путем (для видового определения и оценки антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae*), ВИЧ-инфекции (для определения генотипа ВИЧ первого типа и мутаций резистентности вируса к антиретровирусным препаратам

в участке гена *pol*, кодирующем каталитические ферменты вируса), ВК-вирусов (семейство *Polyomaviridae*). Наборы содержат комплект реагентов, необходимых для амплификации геномной ДНК, кДНК или клонированных ДНК-мишеней. Тест-системы производятся по разработанным технологическим условиям, проходят жесткое тестирование по контролю качества с применением единых методик на самом современном высокотехнологичном оборудовании. В результате апробации была дана высокая оценка аналитических характеристик тест-систем, показана хорошая воспроизводимость анализа. Новые разработки имеют большое социально-экономическое значение и способствуют повышению эффективности диагностики.

Стабильность производства диагностических препаратов зависит от стабильности свойств и безопасности используемых штаммов вирусов и бактерий. На базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии функционирует «Специализированная коллекция вирусов и бактерий, патогенных для человека», объявлена научным объектом, который составляет национальное достояние Республики Беларусь (Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 14 декабря 2012 г. № 1152 «Об объявлении коллекций генетических ресурсов растений, штаммов грибов, вирусов и бактерий, которые составляют национальное достояние»). Эта система создания рабочего банка клеток вирусов и бактерий, является перспективной, актуальной и практически значимой.

Создана и развивается коллекция и криобанк эталонных аттестованных перевиваемых культур клеток человека и животных с целью контроля за вирусными инфекциями в стране и производства диагностических тест-систем (НМФА, ИФА). Центр является производителем культур клеток для выделения вирусов, поставляемых санитарно-эпидемиологической службе республики.

Областью использования новых знаний в Центре является сфера обучения. Ученые Центра активно делятся результатами научных исследований с врачами и специалистами на семинарах и научно-практических конференциях. Важнейшие научные достижения внедряются в практику в лабораториях всех уровней. Получены акты о внедрении результатов НИР и НИОК(Т)Р в практику из учреждений государственного санитарного надзора различных уровней (республиканского, областных, зональных, городских центров гигиены и эпидемиологии), организаций здравоохранения и учреждений высшего и дополнительного образования.

Многочисленные исследования показали результативность использования разработанных в Центре диагностических тест-систем для тестирования биологического материала и объектов окружающей среды с целью мониторинга, выяснения источников возбудителя инфекции при проведении эпидемиологического расследования и подтверждения диагноза [1–3]. Применение ПЦР-анализа способствует быстрому проведению эпидемиологического расследования спорадических или групповых случаев заболеваний и позволяет своевременно организовывать адекватные ситуации противоэпидемические мероприятия [4–6]. Молекулярно-генетические методы исследования позволяют осуществлять динамическое слежение в рамках эпидемиологического надзора за циркулирующими в республике геновариантами вирусов и бактерий, уровнем их генетической изменчивости, прогнозировать формирование эпидемических клонов, оценивать эффективность лечения [7–10].

Для эпидемиологического слежения за инфекционными заболеваниями в Республике Беларусь на базе Центра функционируют национальные референс-центры и референс-лаборатории, сотрудничающие с Европейским региональным бюро Всемирной организации здравоохранения: Национальный центр по гриппу; Национальный референс-центр по полиомиелиту; Региональная лаборатория ВОЗ

по ротавирусной инфекции; Республиканская референс-лаборатория по диагностике кори и краснухи; Референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов; Республиканская референс-лаборатория по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний; Республиканская референс-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С по определению генотипов/субтипов и резистентности к противовирусным препаратам ВИЧ, гепатитов В и С; Республиканская референс-лаборатория по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии; Республиканский референс-центр по диагностике особо опасных, природно-очаговых и вновь возникающих инфекций. Референс-центры и лаборатории регулярно проходят аккредитационные проверки.

Основной ролью национальных центров является проведение государственного санитарно-эпидемиологического слежения за курируемыми инфекциями, обеспечение быстрого реагирования на чрезвычайные ситуации, имеющие потенциальное международное значение. Это обеспечивается разработкой системы мониторинга за циркулирующими возбудителями с использованием молекулярно-генетических методов исследования структуры генов и генетических перестроек, которые являются маркерами изменения эпидемической ситуации [11–14]. Современные молекулярно-биологические технологии расширили возможности по изучению возбудителей инфекционных заболеваний.

Востребованность слежения за клональной структурой популяций возбудителей кишечных, респираторных, парентеральных инфекций обусловлена необходимостью быстрого реагирования при выявлении групповой заболеваемости, слежения за географическим распространением международных эпидемических клонов. Своевременный диагноз на основе молекулярно-генетических методов позволил определить генотип вируса кори, подтвердить распространение завозного случая кори в Минске, отсутствие эндемичной циркуляции возбудителя, разработать адекватные противоэпидемические мероприятия и прервать распространение заболевания в регионе [5, 15].

Подводя итоги вышеизложенному, необходимо отметить, что противоэпидемические и профилактические мероприятия в отношении инфекций, должны основываться на оценке популяционной структуры возбудителей. Новые научные знания, полученные в Центре с помощью молекулярно-генетических методов, предоставляют непосредственную информацию для оценки и прогнозирования эпидемиологической ситуации, и входят в действующую в Республике организационную систему мониторинга эпидемиологической обстановки, в которой участвуют и заинтересованы эпидемиологи Центров гигиены и эпидемиологии и организаций здравоохранения всех уровней.

При осуществлении микробиологического мониторинга важно использование молекулярно-генетических методов, определение генов факторов патогенности и резистентности, проведение генотипирования (определение клонов) и филогенетический анализ (изучение происхождения штаммов) [8, 10, 11, 16, 17]. Результаты генотипирования являются необходимым элементом для принятия решения для терапии, организации и проведения эпидемиологического расследования и инфекционного контроля.

Разработаны и внедрены молекулярно-генетические методы быстрой идентификации и оптимальные схемы типирования возбудителей ОКИ вирусной этиологии, парентеральных гепатитов, респираторных инфекций. Внедрение методов молекулярного анализа позволяет применять генетические маркеры для

идентификации видов и филогенетических исследований при расшифровке групповых случаев заболеваемости.

С помощью филогенетического анализа возможно доказать идентичность, выявить степень генетической родства штаммов, полученных от предполагаемого источника инфекции или фактора передачи [4, 5, 9, 14, 16]. Очевидно, что такая информация крайне важна в работе эпидемиологов центров гигиены и эпидемиологии всех уровней, поскольку применение молекулярно-генетических методов помогает наблюдать за популяционной структурой возбудителей с целью оценки, прогнозирования эпидемической ситуации и обоснования вмешательства в эпидемический процесс, для выявления источников инфекции и факторов передачи во время осложнений эпидемической обстановки.

Специалистами Центра уделяется большое внимание перспективному направлению — проблеме антибиотикорезистентности бактерий и вирусов [17–22]. Антибиотикорезистентность стала четвертой проблемой здравоохранения, вынесенной на обсуждение Генеральной ассамблеи ООН, где члены приняли совместное заявление о необходимости принятия мер по борьбе с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами и контролю за применением противомикробных препаратов. Данное обстоятельство позволяет поставить вопрос о необходимости слежения за популяциями условно-патогенных микроорганизмов с целью прогнозирования формирования и распространения новых мультиантибиотикорезистентных эпидемических клонов. В Республике Беларусь в 2012–2015 гг. разработана стратегия борьбы с резистентностью бактерий к антибиотикам. В результате работы референс-центра по мониторингу резистентности собрана национальная база данных о резистентности микроорганизмов к антибиотикам. В базу добавлены 261 000 записей о выделении изолятов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Центр является национальным корреспондентом ВОЗ, Межгосударственного координационного Совета СНГ по проблемам инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, мониторингу антибиотикорезистентности микроорганизмов и устойчивости к дезинфектантам.

В заключении необходимо отметить, что перед Центром стоят крупные задачи, определяемые эпидемиологической ситуацией по инфекционным заболеваниям в республике и регионе. Научно-инновационная деятельность РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, как ведущего научно-практического учреждения по проблеме контроля инфекционных заболеваний, будет направлена на поддержание устойчивого санитарно-эпидемического благополучия в стране, защиту населения и санитарную охрану ее территории, и обеспечение необходимого уровня биобезопасности Республики Беларусь.

Литература

1. Шмелёва, Н.П. Тяжелые острые респираторные инфекции, ассоциированные с новыми для человека вирусами и их диагностика / Н.П. Шмелёва, Н.В. Грибкова, Н.В. Сивец // Санитарно-эпидемиологическая служба Республики Беларусь : история, актуальные проблемы на современном этапе и перспективы развития : сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 90-летию санит.-эпидемиол. службы Республики Беларусь (Минск, 28 октября 2016 г.): в 2 т. / редкол. : Н. П. Жукова [и др.]. — Минск : БГМУ, 2016. — Т. 2. — С. 224–226.

2. Использование молекулярно-биологических методов для выявления возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом в природных очагах на территории Могилевской области / Е.П. Счесленок, П.А. Семижон, О.Г. Омелянович, Н.Т. Войтенко, А.В. Чайка, А.С. Владыко // Современные проблемы инфекционной патологии человека [Электронный ресурс]: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и

микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — Вып. 9. — С. 165–169. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

3. Мартынов, В. С. Молекулярно-генетическое типирование *Bordetella pertussis* с использованием клинических мазков положительных в ПЦР [Электронный ресурс] / В. С. Мартынов, В. Л. Колодкина // Материалы VIII Ежегод. Всерос. конгресса по инфекц. болезням с междунар. участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. (опубл. в: Инфекц. болезни. — 2016. — Т. 14, прилож. 1. — С. 174). — Режим доступа: http://www.congress-infection.ru/Tezisi_IB-2016_blok.pdf. — Дата доступа: 13.12.2016.

4. Возбудители и молекулярная эпидемиология групповой заболеваемости норовирусной инфекцией в 2015 году в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / Н. В. Поклонская, Т. В. Амвросьева, С. К. Лозюк, К. Л. Дедюля, В. А. Землянский, О. Н. Казинец, З. Ф. Богуш // Материалы VIII Ежегод. Всерос. конгресса по инфекц. болезням с междунар. участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. (опубл. в: Инфекц. болезни. — 2016. — Т. 14, прилож. 1. — С. 14). — Режим доступа: http://www.congress-infection.ru/Tezisi_IB-2016_blok.pdf. — Дата доступа: 13.12.2016.

5. Выявление и генотипирование цепочек передачи вируса кори в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / Е. О. Самойлович, Г. В. Семейко, М. А. Ермолович, Е. Ю. Свирчевская, В. П. Шиманович // Материалы VIII Ежегод. Всерос. конгресса по инфекц. болезням с междунар. участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. (опубл. в: Инфекц. болезни. — 2016. — Т. 14, прилож. 1. — С. 251–252). — Режим доступа: http://www.congress-infection.ru/Tezisi_IB-2016_blok.pdf. — Дата доступа: 13.12.2016.

6. Анализ случаев заболевания респираторно-синцитиальной и метапневмовирусной инфекцией среди детей в Республике Беларусь / Т. П. Лапо, Н. В. Сивец, Н. П. Шмелева, Н. В. Грибкова // Современные проблемы инфекционной патологии человека [Электронный ресурс]: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — Вып. 9. — С. 136–140. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

7. Вирус Добrava — возбудитель геморрагической лихорадки с почечным синдромом, выявлен в природных очагах Могилевской области [Электронный ресурс] / Е. П. Счесленок, П. А. Семижон, О. Г. Омелянович, А. В. Чайка, Н. Т. Войтенко, А. С. Владыко // Материалы VIII Ежегод. Всерос. конгресса по инфекц. болезням с междунар. участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. (опубл. в: Инфекц. болезни. — 2016. — Т. 14, прилож. 1. — С. 273–274). — Режим доступа: http://www.congress-infection.ru/Tezisi_IB-2016_blok.pdf. — Дата доступа: 13.12.2016.

8. Генотипический состав циркулирующих в Республике Беларусь норовирусов / С. К. Лозюк, Н. В. Поклонская, Т. В. Амвросьева, О. Н. Казинец, К. Л. Дедюля, З. Ф. Богуш // Современные проблемы инфекционной патологии человека [Электронный ресурс]: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — Вып. 9. — С. 21–25. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

9. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг эпидемического паротита в Республике Беларусь в условиях низкой заболеваемости / Г. В. Семейко, Е. Ю. Свирчевская, М. А. Ермолович, В. П. Шимонович, Е. О. Самойлович // Санитарно-эпидемиологическая служба Республики Беларусь: история, актуальные проблемы на современном этапе и перспективы развития: сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 90-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь (Минск, 28 октября 2016 г.): в 2 т. / редкол.: Н. П. Жукова [и др.]. — Минск: БГМУ, 2016. — Т. 2. — С. 211–215.

10. Гасич, Е. Л. Особенности распределение генотипов ВГС у пациентов с моноинфекцией и сопутствующей инфекцией ВИЧ и/или ВГВ в Беларуси [Электронный ресурс] / Е. Л. Гасич, В. Ф. Еремин // Материалы VIII Ежегод. Всерос. конгресса по инфекц. болезням с междунар. участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. (опубл. в: Инфекц. болезни. — 2016. — Т. 14, прилож. 1. — С. 70–71). — Режим доступа: http://www.congress-infection.ru/Tezisi_IB-2016_blok.pdf. — Дата доступа: 13.12.2016

11. Колодкина, В. Л. Генетическая вариабельность генов, связанная с вирулентностью вакцинных штаммов и клинических изолятов *Bordetella pertussis*, в Беларуси / В. Л. Колодкина, В. С. Мартынов // Здравоохранение. — 2016. — № 1. — С. 18–23.

12. Эпидемиологическая и молекулярно-генетическая характеристика ротавирусной инфекции в Республике Беларусь / Н.В. Полякова, Н.М. Бискина, В.В. Пашкович, Д.М. Голотик, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович // Санитарно-эпидемиологическая служба Республики Беларусь : история, актуальные проблемы на современном этапе и перспективы развития : сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 90-летию санит.-эпидемиол. службы Республики Беларусь (Минск, 28 октября 2016 г.): в 2 т. / редкол. : Н. П. Жукова [и др.]. — Минск : БГМУ, 2016. — Т. 2. — С. 186–190.
13. Гасич, Е.Л. Генетическое разнообразие вируса гепатита В в Республике Беларусь / Е.Л. Гасич, В.Ф. Еремин, А.С. Немира // Здоровоохранение. — 2016. — № 11. — С. 18–22.
14. Гасич, Е.Л. Генетическое разнообразие вируса гепатита С в Республике Беларусь / Е.Л. Гасич, В.Ф. Еремин // Здоровоохранение. — 2016. — № 10. — С. 24–28.
15. Достижения в элиминации кори и краснухи в Республике Беларусь / Е.О. Самойлович, Г.В. Семейко, В.П. Шиманович, М.А. Ермолович, Е.Ю. Свирчевская // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2016. — № 4. — С. 94–99.
16. Кластерный филогенетический анализ ВИЧ-1 субтипа А1 варианта FSU из разных групп риска в Беларуси свидетельствует о множественной передаче вируса из группы потребителей инъекционных наркотиков в группу с половым путем передачи / С. Сосинович, В. Еремин, Е. Гасич, П. Медстранд // Медицинская вирусология. — 2016. — Т. 30, № 1. — С. 64.
17. Мутации резистентности высокого уровня у ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на ВААРТ [Электронный ресурс] / В.Ф. Еремин, Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович, М.В. Домнич // Материалы VIII Ежегод. Всерос. конгресса по инфекц. болезням с междунар. участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. (опубл. в: Инфекц. болезни. — 2016. — Т. 14, прилож. 1. — С. 97). — Режим доступа: http://www.congress-infection.ru/Tezisi_IB-2016_blok.pdf. — Дата доступа : 13.12.2016.
18. Национальная стратегия борьбы с резистентностью к антибиотикам клинически значимых бактерий в учреждениях здравоохранения Республики Беларусь [Электронный ресурс] / Л.П. Титов, В.А. Горбунов, А.В. Давыдов, Т.С. Ермакова // Материалы VIII Ежегод. Всерос. конгресса по инфекц. болезням с междунар. участием, Москва, 28–30 марта 2016 г. (опубл. в: Инфекц. болезни. — 2016. — Т. 14, прилож. 1. — С. 277). — Режим доступа : http://www.congress-infection.ru/Tezisi_IB-2016_blok.pdf. — Дата доступа : 13.12.2016.
19. Эпидемиологическая характеристика антибиотико-резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих на территории Республики Беларусь / В.В. Пугач, А.А. Ботян, В.А. Горбунов, Ю.А. Шишпорёнок // Тез. XVIII Междунар. конгресса МАКМАХ по антимикробной химиотерапии, Москва, 25–27 мая 2016 г. / Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ); редкол. : А. И. Синопальников (гл. ред.) [и др.] (опубл. в : Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2016. — Т. 18, № 2, прилож. 1. — С. 36–37).
20. Эпидемиологическая характеристика карбапенем-резистентных штаммов *A. baumannii*, циркулирующих на территории Республики Беларусь [Электронный ресурс] / А.А. Ботян, В.В. Пугач, Ю.А. Шишпоренко, В.А. Горбунов, А.В. Давыдов, Л.П. Титов // Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях : материалы II Национального конгресса бактериологов (опубл. в : Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6, № 3. — С. 243). — Режим доступа : <http://iimmun.ru/iimm/article/download/424/294>. — Дата доступа : 14.12.2016.
22. Анализ уровней резистентности к антибактериальным препаратам клинических штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / В.В. Пугач, А.А. Ботян, Ю.А. Шишпоренко, В.А. Горбунов, А.В. Давыдов, Л.П. Титов, Е.В. Уткина // Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях : материалы II Национального конгресса бактериологов (опубл. в : Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6, № 3. — С. 289). — Режим доступа : <http://iimmun.ru/iimm/article/download/424/294>. — Дата доступа : 14.12.2016.

Поступила 05.10.2017

ЭНТЕРОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

*Т.В. Амвросьева¹, З.Ф. Богуш¹, И.Н. Глинская², Н.М. Бискина²,
Н.В. Поклонская¹, С.К. Лозюк¹*

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

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

Резюме. В статье изложены клинико-эпидемиологические и этиологические характеристики энтеровирусных инфекций неполиомиелитной природы в Республике Беларусь в 2016–2017 гг. Проанализированы результаты лабораторной диагностики данной группы инфекций и лабораторного контроля за циркуляцией ее возбудителей среди населения и в объектах окружающей среды. Приведены данные филогенетического анализа новых для республики серотипов и геновариантов энтеровирусов.

Ключевые слова: энтеровирусные инфекции, заболеваемость, эпидемиологический надзор, клинические формы, возрастной состав, неполиомиелитные энтеровирусы, лабораторный контроль, спектр, типовая структура.

Введение. В последние годы наметилась тенденция активизации энтеровирусной инфекции (ЭВИ) в мире, о чем свидетельствует постоянно регистрируемая в разных странах вспышечная заболеваемость. Так, в 2016 г. в ряде Европейских стран (Нидерланды, Испания, Ирландия, Великобритания, Германия, Португалия и др.), а также в США и Корее [1, 2] имели место вспышки ЭВИ с развитием тяжелых клинических форм в виде менингитов, менингоэнцефалитов и других нейроинфекций. В это же время в период сезонного подъема заболеваемости ЭВИ в разных регионах России и в Украине регистрировались вспышки энтеровирусных менингитов [3, 4]. В текущем 2017 году обострение ситуации по ЭВИ отмечается на территории Турции и в Российской Федерации (Тюмень, Нижнетавдинский и Тюменский районы, Челябинская область) [5, 6]. ЭВИ представляют серьезную проблему здравоохранения и в Республике Беларусь [7, 8].

В связи с тем, что ЭВИ неполиомиелитной природы относятся к «вновь возникающим инфекционным болезням» и являются вакцинонеуправляемыми, важную роль в профилактике возможных осложнений эпидситуации играет осуществление эпидемиологического надзора и лабораторного контроля за ними. В Республике Беларусь систематический учет заболеваемости ЭВИ ведется с 2003 года по 5 нозологическим формам: энтеровирусный энцефалит, энтеровирусный менингит, энтеровирусный гастроэнтерит, энтеровирусный везикулярный фарингит, прочие формы ЭВИ.

Настоящая работа посвящена анализу клинико-эпидемиологических и этиологических особенностей развития энтеровирусных инфекций неполиомиелитной природы в Республике Беларусь в 2016–2017 гг.

Материалы и методы исследования. Проведен анализ и обобщены результаты выполненных в отечественных лабораториях центров гигиены и эпидемиологии 21 814 исследований проб клинического материала (фекалии, сыворотки крови, носоглоточные смывы, ликворы) методом выделения неполиомиелитных

энтеровирусов (НПЭВ) в перmissive культурах клеток (RD, Herp 2C, BGM) с последующим установлением их типовой принадлежности в реакции нейтрализации, а также определения энтеровирусных РНК методом ОТ-ПЦР, антигенов и энтеровирусспецифических антител класса М методом ИФА. Проанализированы также полученные результаты 6 249 санитарно-вирусологических исследований проб окружающей среды, включая воду водопроводную, открытых водоемов, водоисточников и колодцев, бассейнов, зон рекреации, сточную, а также смывы с предметов обихода и пищевые продукты.

Молекулярное типирование возбудителей проводили на базе Республиканской референс-лаборатории по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии (далее референс-лаборатория) в соответствии с ранее описанной технологией [9]. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей НПЭВ осуществляли с помощью программы MEGA v.6.0 и BEAST 1.7 [10, 11].

Результаты исследования и обсуждение. Всего в 2016 г. в Республике Беларусь различными клиническими формами ЭВИ неполиомиелитной природы заболело 2278 человек (в 2015 г. — 1322 человека). Подъем заболеваемости начался раньше сезонного — с апреля. Однако удельный вес заболеваний, обусловленных влиянием сезонных факторов, по сравнению с 2015 г., не изменился, составив 31 %. Максимальные показатели фактической заболеваемости ЭВИ регистрировались с августа по ноябрь, достигая пика в сентябре-октябре (292 и 295 эпизодов соответственно). Всплеск заболеваемости энтеровирусными менингитами отмечался в этот же период — 25 и 36 случаев соответственно.

После очередного циклического спада заболеваемости ЭВИ в 2015 г. (показатель заболеваемости составил 14,0 на 100 тысяч населения), в 2016 г. этот показатель регистрировался на уровне 24,11, что свидетельствовало об увеличении интенсивности инфекционного процесса в 1,7 раза (рисунок 1). В 1,6 раза увеличился и показатель заболеваемости серозным менингитом.

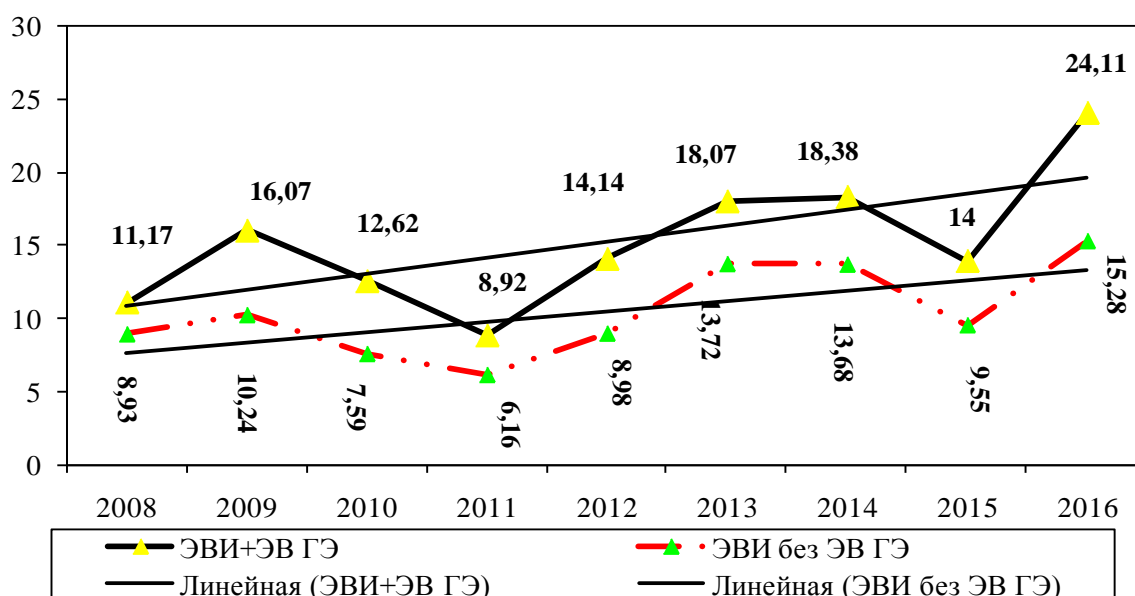


Рисунок 1. — Динамика заболеваемость ЭВИ за 2008–2016 гг. (на 100 тысяч населения)

В возрастной структуре ЭВИ преобладали дети до 14 лет, их доля составила 86 %.

Как и в предыдущие годы, в 2016 г. отмечалось неравномерное распределение заболеваемости по административным территориям Республики Беларусь. Разброс показателей на 100 тысяч населения составил от 4,76 в Могилевской области до 54,68 в г. Минске (рисунок 2). Учитывая повсеместную распространенность энтеровирусов, такая вариабельность уровней заболеваемости в значительной мере определяется качеством лабораторного контроля за ЭВИ, включая состояние диагностики и полноту регистрации инфекции. Неоспоримое влияние на ситуацию оказывает также наличие условий, способствующих появлению и циркуляции новых для территорий серо- и генотипов НПЭВ.

Наиболее высокий уровень заболеваемости в 2016 г. регистрировался в г. Минске, где ее показатель был в 2,2 раза выше республиканского. Превышение республиканского уровня также отмечено в Брестской и Гродненской областях (показатели составили 29,13 и 27,11 на 100 тысяч населения соответственно). По сравнению с 2015 г., во всех областях республики, за исключением Витебской, отмечался рост заболеваемости.

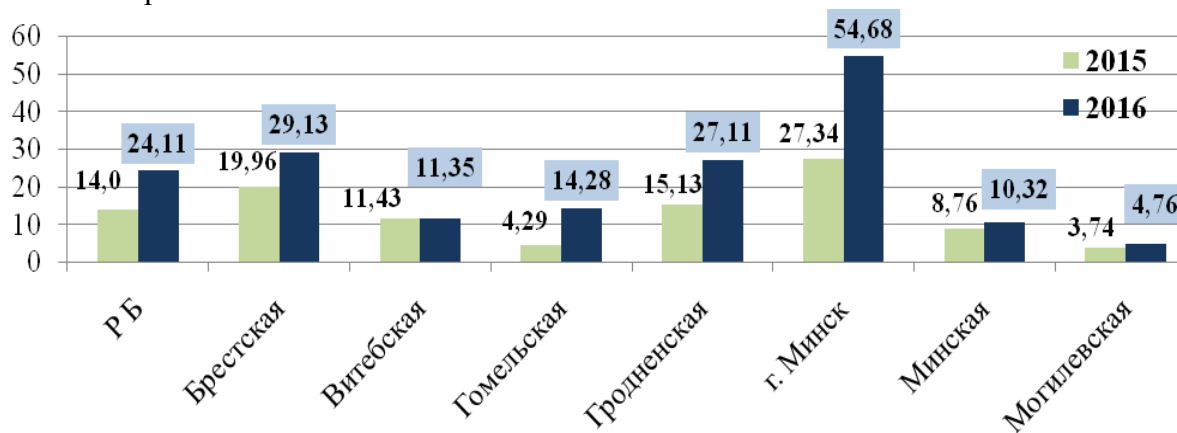


Рисунок 2. — Сравнительная заболеваемость ЭВИ в разрезе административных территорий и Республики Беларусь за 2015 — 2016 гг. (на 100 тысяч населения)

В целом по стране в структуре клинических форм ЭВИ в 2016 г. доминировали энтеровирусные фарингиты, вклад которых составил 40,0 %. Удельный вес энтеровирусных гастроэнтеритов составил 36,6 %, прочих форм — 18,5 %. На долю энтеровирусных менингитов и энцефалитов пришлось 4,4 % и 0,4 % соответственно. По сравнению с предыдущим годом, нозологическая структура ЭВИ характеризовалась увеличением удельного веса гастроэнтеритов на 4,8 %, менингитов на 0,4 %, энцефалитов на 0,1 % и снижением фарингитов на 5,5 %. При этом энтеровирусные гастроэнтериты преобладали в Брестской, Минской и Гомельской областях (83,4 %, 60,6 %, 40,9 % соответственно), энтеровирусные менингиты — в Гомельской области (24,6 % или 50 случаев), энтеровирусные фарингиты — в г. Минске и Гродненской области (61,5 % и 48,4 %), прочие формы — в Могилевской и Витебской областях (42,5 % и 42,3 %) (рисунок 3).

Что касается 2017 г., то по данным статистического учета в целом по стране заболеваемость ЭВИ за истекшие 7 месяцев (по состоянию на 1 августа) снизилась на 36,3 % по сравнению с аналогичным периодом прошлого года (таблица 1). Ее рост в текущем году отмечался на территориях Витебской (в 3,8), Брестской (в 2 раза), Минской и Могилевской (в 1,6 раза) областей. В остальных регионах (Гомельская и Гродненская области, г. Минск) наблюдалось снижение заболеваемости ЭВИ. Заболеваемость энтеровирусными менингитами в республике за анализируемый период

снизилась на 25,0 %. И лишь на территории Гомельской области регистрировался ее рост более чем в 2 раза (таблица 1).

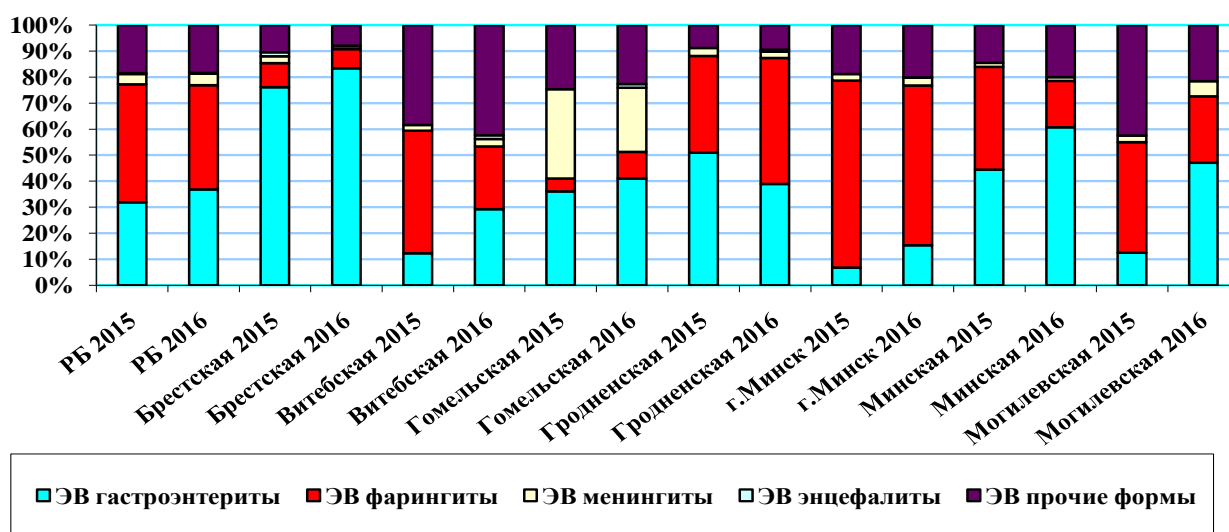


Рисунок 3. — Структура клинических форм ЭВИ в разрезе территорий и Республики Беларусь за 2015–2016 гг., %

Таблица 1. — Заболеваемость ЭВИ неполиомиелитной природы и энтеровирусными менингитами за 7 месяцев 2016–2017 гг., в абсолютных числах и на 100 тысяч населения

Административный регион	7 месяцев 2016 г.		7 месяцев 2017 г.	
	Абсолютное количество заболевших ЭВИ (в том числе энтеровирусным менингитом)	На 100 тысяч населения	Абсолютное количество заболевших ЭВИ (в том числе энтеровирусным менингитом)	На 100 тысяч населения
Брестская	22 (0)	1,65 (0)	45 (1)	3,37 (0,08)
Витебская	17 (1)	1,42 (0,1)	64 (1)	5,34 (0,1)
Гомельская	43 (3)	3,02 (0,21)	23 (7)	1,61 (0,49)
Гродненская	65 (4)	6,20 (0,38)	23 (0)	2,19 (0)
г. Минск	441 (11)	22,42 (0,55)	194 (6)	9,87 (0,3)
Минская	20 (0)	1,39 (0)	33 (0)	2,30 (0)
Могилевская	5 (0)	0,46 (0)	8 (0)	0,75 (0)
Всего по РБ	613 (19)	6,47 (0,2)	390 (15)	4,12 (0,15)

По результатам комплексного (вирусологического и молекулярно-генетического) анализа циркулирующих на территории республики возбудителей ЭВИ установлено, что подъем заболеваемости ЭВИ в регионах в 2016 г. был вызван разными типами НПЭВ, которые относились к 3 серогруппам: Коксаки В (серотипы 3, 4, 5), Коксаки А (серотип 9) и ЕСНО (серотипы 3, 6, 7, 9, 16, 19) — таблица 2. В типовой

структуре выявленных возбудителей ЭВИ доминировали вирусы ЕСНО, которые составили 53,8 %. На долю вирусов Коксаки В пришлось 32,3 %, Коксаки А — 1,5 %. Вирусы с неустановленным серотипом составили 12,3 %. Из особенностей типовой циркуляции НПЭВ в этот период следует отметить смену доминирующих групп. Так, если в 2015 г. с небольшим перевесом лидировали представители Коксаки В вирусов (их удельный вес в общей структуре возбудителей составил 39,8 %), то в 2016 г. возросла доля ЕСНО вирусов (53,8 %). Среди них, наряду с продолжением циркуляции ЕСНО 3, 6 и 16 серотипов, появились относительно новые для республики серотипы, циркуляция которых в предшествующий период не регистрировалась — ЕСНО 7, 9 и 19. При этом вирусы ЕСНО 9, циркуляция которых отмечалась на территории Гомельской, Могилевской областей и столичного региона, имели максимальный удельный вес в общем пуле всех зарегистрированных по стране НПЭВ — 20,0 %.

Молекулярное типирование 22 изолятов НПЭВ из спинномозговой жидкости пациентов с тяжелыми неврологическими формами ЭВИ показало, что 13 из них принадлежали к вирусу ЕСНО 9 (59,1 %), 5 — к вирусу ЕСНО 16 (22,7 %), 2 — к вирусу ЕСНО 6 (9,1 %), по 1 изоляту (4,5 %) — к вирусам ЕСНО 19 и Коксаки А 9. Следует отметить, что абсолютное большинство вирусов ЕСНО 9 было идентифицировано в пробах пациентов из Гомельской области и г. Минска.

Таблица 2. — НПЭВ, идентифицированные на территории Республики Беларусь в 2016 г.

Тип НПЭВ	Областной регион							Всего
	Витебский	Гомельский	Минский	Брестский	Могилевский	Гродненский	Г. Минск	
ЕСНО 3	5	-	-	-	-	-	-	5
ЕСНО 6	2	-	-	-	1	-	5	8
ЕСНО 7	3	-	-	-	-	-	-	3
ЕСНО 9	-	8	-	-	1	-	4	13
ЕСНО 16	-	4	-	-	1	-	-	5
ЕСНО 19	-	1	-	-	-	-	-	1
Коксаки А 9	-	-	-	-	-	-	1	1
Коксаки В 3	1	-	-	7	1	-	-	9
Коксаки В 4	-	-	-	-	2	2	-	4
Коксаки В 5	3	2	-	-	2	-	1	8
НПЭВ с неустановленным серотипом	-	3	1	1	1	-	2	8

В результате проведенного филогенетического анализа изолятов ЕСНО 9 была установлена их значительная генетическая гетерогенность. Они принадлежали к 4 геновариантам: L1, L2, K1 и ω. Геновариант L2, который циркулировал на территории Могилевской области, имел 97 % сходства с вирусами ЕСНО 9, циркулировавшими в России в 2009 г., и 93 % сходства с ранее циркулировавшими в Беларуси (в 2013 г. на территории Витебской области). В Могилевской области в 2016 г. не был зарегистрирован значительный подъем заболеваемости энтеровирусным менингитом.

Можно предположить, что данный геновариант уже достаточно длительное время циркулировал на территории нашей страны и России, вызывая спорадическую заболеваемость ЭВИ.

На территории Минска и Гомельской области были идентифицированы геноварианты L1, K1 и ω. Геновариант L1 имел 95 % сходства с вирусами ЕСНО 9, вызвавшими заболеваемость менингоэнцефалитами в 2009 г. в Шри-Ланке, что указывало на его высокую вирулентность. Геновариант K1 был наиболее близок вирусам, циркулировавшим в прошлые годы в Европейском регионе (Испания, 2003, Нидерланды, 2009). Генетическая линия ω, помимо «белорусских изолятов» 2016 г., включала вирусы, циркулировавшие в Бразилии и Аргентине в 2002–2003 гг.

Филогенетическая реконструкция позволила установить, что вирусы ЕСНО 16 (Гомельская и Могилевская области) принадлежали к геноварианту, который обладал значительным сходством (97 %) с вирусами, циркулировавшими на территории КНР в 2009–2010 гг. Такая ситуация достаточно часто имела место по наблюдениям последних лет — геноварианты, которые формируются в результате крупных вспышек ЭВИ в Китае в последствии распространяются через территорию сопредельных стран и спустя несколько лет появляются на территории нашей страны.

Вирусы Коксаки А 9 (г. Минск) также были представлены новым для нашей страны геновариантом. Так, если в 2013 г. в Республике Беларусь циркулировал геновариант Коксаки А 9 G1b, в 2014–2015 гг. — геновариант Коксаки А 9 G1a, то в 2016 г. имела место циркуляция геноварианта Коксаки А 9 G1I.

По состоянию на август 2017 г. пейзаж НПЭВ, изолированных в текущем году от пациентов с ЭВИ, а также из объектов окружающей среды на территории столичного региона, Гомельской и Могилевской областей, представлен вирусами Коксаки А 24 и Коксаки В 5.

Заключение. В результате проведенных исследований выявлены следующие особенности развития эпидемического процесса ЭВИ неполиомиелитной природы в нашей стране в 2016 г.:

— нетипичное для сезонного, более раннее (с апреля) начало подъема заболеваемости и ее рост (в 1,7 раза) с вовлечением в эпидемический процесс преимущественно детей в возрасте до 14 лет;

— этиологическая связь роста заболеваемости со сменой доминирующих серотипов НПЭВ и их выраженной генетической гетерогенностью, включающей как различные геноварианты ранее циркулировавших вирусов ЕСНО 16, Коксаки А 9, так и относительно новых для республики возбудителей ЭВИ, которые в предшествующий период не регистрировались — вирусов ЕСНО 9, ЕСНО 7, ЕСНО 19;

— наличие тяжелых нейроинфекций, в том числе вызванных новыми, не зарегистрированными в международном генбанке, геновариантами вируса ЕСНО 9.

Авторы статьи выражают благодарность специалистам региональных вирусологических служб Центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья за плодотворное сотрудничество и помощь в предоставлении клинического материала.

Литература

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid Risk Assessment — Enterovirus detections associated with severe neurological symptoms in children and adults in European countries, 8 August 2016. — Stockholm: ECDC, 2016 [Electronic resource]. — Mode of access: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/01-08-2016-RRA-Enterovirus%2071-Spain,%20France,%20Netherlands.pdf>. — Date of access: 09.02.2017.

2. Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus D68 2016 ([updated 19 July 2016, 3 August 2016) [Electronic resource]. — Mode of access : <http://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/ev-d68.html#outbreak>. — Date of access : 09.02.2017.
3. Под Хабаровском в детском лагере произошла вспышка менингита [Электронный ресурс] // Сетевое издание «РИА Новости», 03.08.2016. — Режим доступа : <http://ria.ru/incidents/20160803/1473501223.html>. — Дата доступа : 09.02.2017.
4. Шаповалова, Ю. В Облздраве прокомментировали случаи заболевания менингитом в Люботине [Электронный ресурс] / Ю. Шаповалова // Медиа группа «Объектив», Харьков, 7 октября 2016 г. — Режим доступа : <http://www.objectiv.tv/071016/133888.html>. — Дата доступа : 09.02.2017.
5. Инфекцию уже завезли в Украину [Электронный ресурс] // Сетевое издание «Вести», 02.08.2016. — Режим доступа: <http://vesti-ukr.com/strana/250355-infektsiju-uzhe-zavezli-v-ukrainu-virus-koksa-ki-kosit-turistov-v-turtsii>. — Дата доступа : 01.09.2017.
6. В Тюмени вспышка серозного менингита [Электронный ресурс] // Сетевое издание «Красный север», 31.07.2016. — Режим доступа : <https://ks-yanao.ru/novosti/v-tyumeni-vspyshka-seroznogo-meningita.html>. — Дата доступа : 29.08.2017.
7. Молекулярно-эпидемиологический анализ неполиомиелитных энтеровирусов, доминирующих в Беларуси в 2012–2013 гг. / Н. В. Поклонская [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2014. — № 4. — С. 58–64.
8. Особенности циркуляции возбудителей энтеровирусных инфекций в Республике Беларусь в 2014–2015 годах / З. Ф. Богуш [и др.] // Мед. новости. — 2016. — № 12. — С. 59–63.
9. Результаты генетического анализа региона, кодирующего РНК-полимеразу вируса Коксаки В 5 [Электронный ресурс] / Н.В. Поклонская, С.К. Лозюк, А.К. Прядко, Т.В. Амвросьева // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — Вып. 9. — С. 140–146. — Режим доступа : http://med.by/content/ellibsci/RNPCEIM/rnpceim_2016_9.pdf. — Дата доступа : 04.09.2017.
10. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729.
11. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. / A.J. Drummond [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2012. — Vol. 29. — P. 1969–1973

THE ENTEROVIRAL INFECTIONS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

*T.V. Amvrosieva¹, Z.F. Bohush¹, I.N. Glinskaya², N.M. Biskina²,
N.V. Poklonskaya¹, S.K. Lozyuk¹*

¹*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;*

²*Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus*

The paper describes the clinical, epidemiological and etiological characteristics of the human non-polio enteroviral infections in Belarus in 2016–2017. The results of laboratory diagnostics of this group of infections and laboratory monitoring of the circulation of its pathogens among the population and in environmental objects are analyzed. The paper contains the data of the phylogenetic analysis of new serotypes and genovariants.

Keywords: enteroviral infection, incidence, epidemiological surveillance, clinical form, age group, non-polio enteroviruses, laboratory control.

Поступила 04.09.2017.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РАССЛЕДОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КИШЕЧНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

*Т.В. Амвросьева, З.Ф. Богуш, О.Н. Казинец, Н.В. Поклонская, Ю.А. Шилова,
С.К. Лозюк, А.С. Аринович*

*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь*

Резюме. Контаминированные кишечными вирусами (адено-, норо-, рота-, сапо-, астро-, энтеровирусы и др.) объекты госпитальной среды, вода и пища представляют угрозу вирусологической безопасности пациентов, персонала, посетителей и других лиц, связанных с медицинским учреждением.

В статье изложен алгоритм молекулярно-эпидемиологического расследования заболеваемости кишечными вирусными инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, включающий порядок и методы клинических и санитарно-вирусологических исследований, а также критерии и показатели оценки эпидбезопасности госпитальной среды в отношении вирусных патогенов, который рекомендуется использовать при осуществлении санитарного надзора за учреждениями здравоохранения.

Ключевые слова: кишечные вирусы, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, объекты госпитальной среды, вода, пища, молекулярно-эпидемиологические исследования.

Введение. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП) являются серьезной проблемой во всем мире. По данным различных исследователей они развиваются у 3–10 % госпитализированных пациентов. В России предполагаемое число ИСМП составляет 2,5 млн. Основные усилия по решению данной проблемы в настоящее время направлены на борьбу с бактериальными ИСМП. Вклад вирусных агентов остается мало изученным в связи с недостаточным внедрением диагностических и санитарно-вирусологических исследований в отношении отдельных нозологических форм. Вместе с тем, ведущая роль вирусных патогенов в формировании основной массы заболеваемости ИСМП становится сегодня все более очевидной. Так, по данным зарубежных исследователей среди возбудителей диарейных ИСМП доля вирусов составляет 91–94 %. В структуре заболеваемости ИСМП вирусной этиологии, имеющей наибольшую социальную значимость с точки зрения массовости, частоты встречаемости и скорости распространения, особое место занимают кишечные инфекции, для которых характерен фекально-оральный механизм передачи. Как известно, в развитии их эпидемического процесса важная роль принадлежит объектам госпитальной среды (ОГС), которые являются материальной основой реализации контактно-бытового пути передачи возбудителей [1, 2]. При этом нельзя забывать о возможных водном и пищевом путях распространения инфекции. Учитывая тот факт, что в основной своей массе кишечные вирусные инфекции являются вакцинонеуправляемыми и для их лечения отсутствуют этиотропные противовирусные средства, пресечение пути передачи возбудителей через ОГС, воду и пищу является одним из эффективных способов борьбы с ними [2, 3]. Несмотря на наличие многочисленных сведений о вспышках так называемых нозокомиальных кишечных вирусных инфекций, наиболее часто возникающих в закрытых коллективах (лечебных учреждениях, госпиталях, домах престарелых, домах ребенка, детских

лагерях и т.д.) в результате контаминации ОГС, их роль и механизмы трансмиссии инфекционных вирусных агентов в настоящее время изучены далеко неполно [2, 3].

Согласно результатам ранее проведенных нами пилотных исследований по изучению контаминации кишечными вирусными агентами поверхностей ОГС в условиях инфекционных стационаров частота выявления вирусов-контаминантов была достаточно высокой. На контаминированных поверхностях обнаруживался широкий спектр известных возбудителей вирусных острых кишечных инфекций (ОКИ) (аденовирусы (АдВ) 40,41 типов, норовирусы (НоВ), ротавирусы (РВ), энтеровирусы (ЭВ), астровирусы (АсВ), саповирусы (СаВ), парэховирусы (ПЭВ) и др.) [4].

Несмотря на высокую актуальность и социально-экономическую значимость обсуждаемой проблемы, методологические аспекты лабораторного контроля за кишечными вирусными ИСМП в Республике Беларусь не разработаны. До настоящего времени научные исследования на эту тему не проводились. В связи с этим отсутствуют какие-либо аргументированные данные об их этиологической структуре, частоте, причинах возникновения, эпидемически значимых факторах передачи. Отсутствуют также необходимые инструктивно-методические и нормативные документы, регламентирующие подходы, порядок и методы лабораторного контроля за вирусными ИСМП, а также критерии и показатели оценки эпидбезопасности госпитальной среды в отношении вирусных патогенов.

Исходя из вышеизложенного, **целью** работы явилась разработка алгоритма молекулярно-эпидемиологического расследования заболеваемости кишечными вирусными ИСМП с определением порядка, технологий, методов выявления их возбудителей и установлением причинно-следственных связей в условиях госпитальной среды.

Материалы и методы исследования. Рекомендуемые для проведения диагностических, санитарно-вирусологических и молекулярно-эпидемиологических исследований материалы и методы указаны по ходу изложения статьи в соответствии с действующими в Республике Беларусь инструкциями по их применению [5–12].

Результаты исследования и обсуждение. В настоящее время существует множество определений ИСМП (синонимы «внутрибольничная инфекция», «госпитальная инфекция», «нозокомиальная инфекция»). Согласно действующим в Республике Беларусь нормативным документам [13, 14], ИСМП — это любое клинически распознаваемое инфекционное заболевание, которое поражает пациента в результате его поступления в учреждение здравоохранения или обращения за лечебной помощью, или инфекционное заболевание сотрудника вследствие его работы в данном лечебном учреждении. В некоторых зарубежных документах это определение конкретизируется сроками появления клинических симптомов инфекции, как, например, в США: ИСМП — это инфекция, которая развивается у пациента спустя 48 часов после поступления в учреждение здравоохранения [15].

На основе изучения отечественного и международного опыта по данной проблеме и с учетом клинико-эпидемиологических особенностей кишечных вирусных инфекций при установлении случая/случаев кишечных вирусных ИСМП нами рекомендуется использование следующих критериев:

— наличие у пациента/пациентов клинических симптомов острого гастрита, гастроэнтерита, энтерита и других поражений желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся диареей и симптомами интоксикации, которые развиваются спустя 24–48 часов после их госпитализации либо посещения лечебного учреждения, а также у медицинского персонала в силу осуществляемой им деятельности;

— лабораторное подтверждение вирусной этиологии кишечной инфекции;

— лабораторное подтверждение контаминации госпитальной среды возбудителем/возбудителями кишечной инфекции;

— молекулярно-эпидемиологическое подтверждение ассоциативной связи кишечной инфекции с контаминацией госпитальной среды ее возбудителем/возбудителями.

В каждой конкретной ситуации, указывающей на реальность (возможность) развития ИСМП, необходимо разработать рабочую программу проведения комплекса диагностических, санитарно-вирусологических и молекулярно-эпидемиологических исследований, включающую:

- детектируемый возбудитель (возбудители);
- методы и диагностически значимые маркеры выявления возбудителей;
- перечень контролируемых ОГС, включая потребляемую воду и пищу;
- вид и количество исследуемых проб клинического и санитарно-вирусологического материала;
- кратность исследований;
- критерии анализа и оценки полученных результатов на предмет установления случая/случаев ИСМП.

Порядок и методы диагностических исследований. С учетом принятых нами критериев установления случая/случаев кишечных вирусных ИСМП показанием для проведения лабораторной диагностики является «наличие у пациента/пациентов клинических симптомов острого гастрита, гастроэнтерита, энтерита и других поражений желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся диареей и симптомами интоксикации, которые развиваются спустя 24–48 часов после их госпитализации либо посещения лечебного учреждения, а также у медицинского персонала в силу осуществляемой им деятельности».

В качестве клинического материала для проведения лабораторной диагностики используются образцы фекалий и/или рвотных масс (с учетом регистрируемых клинических признаков). Наиболее оптимальными сроками для отбора образцов являются первые 2–3 суток от момента клинических проявлений. При проведении ретроспективных исследований образцы могут быть взяты позже — в течение 1–2 недель после исчезновения симптомов заболевания, что позволяет сроки выделения кишечных вирусов после перенесенной инфекции. В условиях групповой заболеваемости клинический материал должен быть забран не менее чем у 5–10 заболевших пациентов [5–7].

Перечень детектируемых вирусных патогенов включает следующий спектр актуальных для нашей страны возбудителей: РВ, НоВ, АдВ 40, 41 типов, ЭВ, АсВ, СаВ, ПЭВ.

Диагностические исследования, в зависимости от конкретной ситуации и клинико-эпидемиологических особенностей регистрируемой инфекции, осуществляются в 2 этапа. Первый из них (скрининговый) касается детекции наиболее распространенных доминирующих возбудителей вирусных ОКИ и ОГЭ: РВ, НоВ, АдВ 40, 41 типов, ЭВ. В случае получения отрицательных результатов выполняются дальнейшие исследования на предмет выявления других возможных кишечных возбудителей: АсВ, СаВ, ПЭВ и др.

Методом выбора для дифференциальной диагностики кишечных вирусных ИСМП является ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. В случае детекции РНК-содержащих вирусов (РВ, НоВ, АсВ, СаВ, ЭВ и ПЭВ) используется ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) с последующей амплификацией полученной вирусной кДНК.

При оценке результатов лабораторной диагностики используется следующий подход. В условиях регистрации отдельных случаев ИСМП получение положительного результата в отношении соответствующего кишечного патогенна (или нескольких патогенов) является достаточным основанием для признания его (их) этиологическим(и) агентом(ами). При расследовании групповой заболеваемости ИСМП критерием установления этиологической роли кишечного вируса — как возбудителя ИСМП — является его выявление не менее чем у 30 % заболевших.

Порядок и методы санитарно-вирусологических исследований. Санитарно-вирусологические исследования являются одним из наиболее сложных и трудоемких этапов комплекса лабораторных работ по установлению случая (случаев) кишечных вирусных ИСМП. Основной их целью является выявление загрязнения госпитальной среды возбудителем ИСМП для установления факторов и путей их передачи.

С учетом ведущих путей передачи кишечных вирусных инфекций (контактно-бытовой, водный, пищевой) объектами санитарно-вирусологических исследований являются поверхности предметов и ОГС, а также потребляемые пациентами питьевая вода и пища. При выборе объекта исследований необходимо учитывать данные предварительно проведенного эпидобследования госпитального очага. Так, одновременное возникновение случаев кишечной инфекции в разных отделениях ЛПУ, массовость регистрируемых заболеваний (вспышечный характер) с одинаковой клинической картиной и инкубационным периодом указывают на наличие централизованного фактора передачи, каким может быть водопроводная вода или продукты питания из госпитального пищеблока. Регистрация отдельных случаев инфекции, различающихся по времени возникновения и локализации, указывает на ассоциацию фактора передачи возбудителя с поверхностями ОГС. К последним относятся многочисленные предметы и объекты, окружающие пациента в связи с его пребыванием в учреждении здравоохранения (мебель, дверные ручки, перила, посуда, одежда, постельные принадлежности, игрушки, телефонные аппараты, компьютерная техника, стены, полы и т.д.), а также специальное медицинское оборудование или аппараты, разные медицинские приспособления, медицинская спецодежда, руки персонала и пациентов и т.д. Вирусное загрязнение ОГС лежит в основе реализации контактно-бытового пути распространения ИСМП.

Следует отметить, что лабораторное выявление вирусного загрязнения ОГС, воды, пищевых продуктов является технологически непростым и трудоемким процессом, что обусловлено крайне низким содержанием в них вирус-контаминантов. Данное обстоятельство требует использования специальных подходов к отбору образцов из госпитальной среды и их пробоподготовке.

В основе ранее разработанных нами технологий пробоподготовки смывов с ОГС, образцов воды и пищи лежит процесс концентрирования вирусных частиц путем их сорбции на вируссорбирующем материале и последующей элюции малым объемом буферного раствора. Результатом этого этапа является получение элюата, который, при необходимости, может подвергаться дополнительному концентрированию с использованием ПЭГ [8–12]. Именно данные технологии рекомендуются для использования при отборе образцов и их пробоподготовке — как первый этап проведения санитарно-вирусологических исследований в госпитальной среде. Второй этап посвящен непосредственной детекции «уловленных» вирус-контаминантов в сконцентрированных пробах. Методом выбора для этих исследований является ПЦР — как наиболее чувствительный и доступный в практическом использовании [9–12]. Получение положительного результата ПЦР анализа, указывающего на наличие генетического материала вирусного патогена в пробе ОГС и/или воде, пище, является достаточным доказательством вирусной контаминации госпитальной среды.

Алгоритм молекулярно-эпидемиологического расследования заболеваемости ИСМП. Основной задачей разработанного алгоритма молекулярно-эпидемиологического расследования случаев кишечных вирусных ИСМП является получение фактических данных в пользу наличия или отсутствия ассоциативной связи заболеваемости с контаминацией госпитальной среды ее возбудителем (возбудителями). Данное расследование включает 4 этапа: генодиагностические исследования клинического материала пациентов, санитарно-вирусологические исследования госпитальной среды, молекулярное типирование обнаруженных у пациентов и в пробах из госпитальной среды возбудителей инфекции, филогенетический анализ «клинических» и «госпитальных» вирусных патогенов. Схематично разработанный алгоритм представлен на рисунке 1.

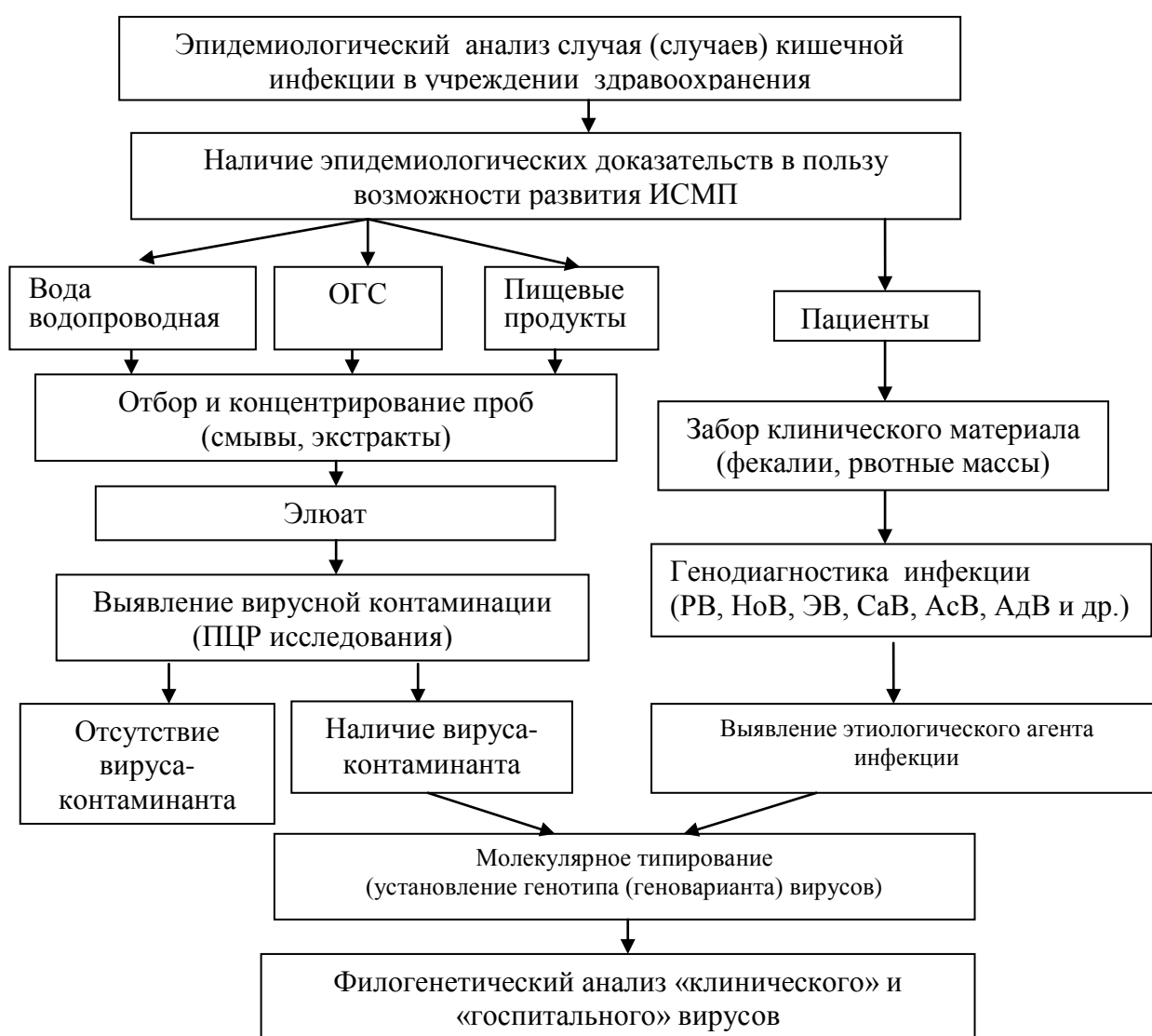


Рисунок 1. — Алгоритм молекулярно-эпидемиологического расследования заболеваемости кишечными вирусными ИСМП

Его конечные этапы базируются на использовании самых современных методов молекулярной эпидемиологии с применением сравнительного биоинформационного (филогенетического) анализа, целью которого является определение степени идентичности этиологического агента расследуемой заболеваемости и вируса-контаминанта госпитальной среды на генетическом уровне.

Оценка полученных в ходе расследования заболеваемости результатов осуществляется на основании следующих критериев, отражающих эпидбезопасность госпитальной среды в отношении кишечных вирусных патогенов:

- эпидемиологические данные о возможности развития ИСМП;
- высокая степень генетического сходства (не менее 98,5 %) обнаруженных «клинических» и «госпитальных» вирусов.

Наличие соответствия полученных данных указанным критериям в совокупности позволяет квалифицировать расследуемую заболеваемость как ИСМП.

Заключение. На сегодняшний день в нашей стране при осуществлении государственного санитарного надзора за учреждениями здравоохранения необходимые исследования по контролю за обеспечением вирусологической безопасности пациентов, связанной с ОГС, не выполняются, что не способствует проведению соответствующих профилактических мероприятий. Обусловлено это несовершенством существующей методической базы. Одним из ключевых звеньев такого контроля является установление причинно-следственной связи между событием ИСМП и фактом обнаружения ее возбудителя (вирусного агента) на поверхности ОГС и/или в употребляемой воде или пище. Успешному решению этой задачи будет способствовать практическое применение разработанного алгоритма расследования заболеваемости кишечными вирусными ИСМП.

Литература

1. Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces / K. Cherer [et al.] // *Food Environ. Virol.* — 2009. — Vol. 1. — P. 42–49.
2. Norovirus on swabs taken from hands illustrate route of transmission: a case study / I. Voxman [et al.] // *J. Food Protect.* — 2009. — Vol. 72. — P. 1753–1755.
3. Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites / T. R. Julian [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 77. — P. 6918–6925.
4. Амвросьева Т. В. Новые методические решения выявления вирусной контаминации объектов среды обитания человека / Т. В. Амвросьева, О. Н. Казинец // *Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. Г. Е. Косяченко.* — Минск, 2013. — Вып. 22. — С. 3–6.
5. Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 15.12.2010 № 111–1210. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2011. — 24 с.
6. Алгоритм лабораторной диагностики норовирусной инфекции: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 25.03.2014 № 014–1213. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2014. — 16 с.
7. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.06.2009 № 165–1208. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2009. — 34 с.
8. Методы отбора и концентрирования проб из объектов среды обитания человека для проведения санитарно-вирусологических исследований: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 25.03.2014 № 016–1213. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2014. — 10 с.
9. Алгоритм санитарно-вирусологического контроля объектов среды обитания человека: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 16.12.2015 № 013–1115. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2015. — 14 с.
10. Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.06.2009 № 166–1208. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2009. — 22 с.
11. Алгоритм санитарно-вирусологического контроля питьевой воды: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Республики Беларусь 25.03.2014 № 021–1213. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2014. — 14 с.

12. Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 13.06.2013 № 002–0213. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2013. — 16 с.

13. Об утверждении Санитарных норм, правил и гигиенических нормативов «Гигиенические требования к устройству, оборудованию и содержанию организаций здравоохранения, к проведению санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий по профилактике инфекционных заболеваний в организациях здравоохранения»: постановление М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 09 авг. 2010 г., № 109.

14. О проведении учета, регистрации и анализа ВБИ в лечебно-профилактических учреждениях БССР: приказ М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 04 сент. 1987 г., № 179.

15. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities: Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) [Electronic resource] // MMWR. — 2003. — Vol. 52 (RR10). — P. 1–42. — Mode of access: <https://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/rr5210a1.htm>. — Date of access: 08.12.2016.

MODERN APPROACHES AND METHODS OF MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF HEALTH CARE-ASSOCIATED INFECTIONS

*T.V. Amvrosieva, Z.F. Bohush, O.N. Kazinets, Yu.A. Shilova,
N.V. Paklonskaya, C.K. Laziuk, A.S. Arinovich*

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

Contaminated with enteric viruses (adeno-, noro-, rota-, sapo-, astro-, enteroviruses, etc.) objects of the hospital environment, water and food pose a threat to the patients, medical personnel, visitors and other persons associated with the medical institution.

The article describes the algorithm of molecular-epidemiological investigation of health care-associated enteric viral infections, including the order and methods of clinical and sanitary-virological studies, as well as the criteria and indicators for assessing the epidemiological safety of the hospital environment for viral pathogens. This algorithm is recommended to implement in the sanitary supervision of health care institutions.

Keywords: enteric viruses, health care-associated infections, objects of the hospital environment, water, food, molecular-epidemiological studies.

Поступила 06.09.2017

МЕНИНГОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И РЕГИОНАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

М.И. Бандацкая¹, Е.В. Горбачева¹, А.М. Дронина², Г.Н. Чистенко¹

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь

Резюме. В статье описаны основные закономерности проявлений эпидемического процесса менингококковой инфекции в возрастных группах и регионах Республики Беларусь в 1995–2016 гг. Установлена сильная обратная корреляционная зависимость заболеваемости менингококковой инфекцией и охватом прививками против гриппа. Снижение циркуляции вируса гриппа могло препятствовать формированию эпидемических вариантов менингококков.

Ключевые слова: менингококк, эпидемиология, заболеваемость, группы риска, вакцинация.

Введение. Менингококковой инфекции принадлежит особое место среди детских инфекций в силу непредсказуемого развития угрожающих жизни состояний. При отсутствии адекватной терапии она в 5–50 % случаев заканчивается смертью. Согласно данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется до 1,2 млн. случаев генерализованных форм инфекции, летальность при этом составляет в среднем 13 %, то есть от данной инфекции ежегодно погибает около 135 тыс. человек и более половины из них — дети. Возбудитель инфекции широко циркулирует среди населения. Считается, что 10–20 % человек являются носителями *N. meningitidis* в любой момент времени. Однако в период эпидемического неблагополучия число носителей может быть и выше [1, 2].

Цель работы: выявить закономерности эпидемического процесса менингококковой инфекции на территории Республики Беларусь.

Материал и методы. Материалом послужили данные официальной регистрации случаев менингококковой инфекции в Республике Беларусь за период с 1995 по 2016 гг. Заболеваемость в возрастных группах анализировалась с 1998 по 2016 гг., в регионах республики — с 2009 по 2016 гг. Нами проведено сплошное, ретроспективное, продольное эпидемиологическое исследование [3]. Достоверность различий оценивалась по критерию *t* Стьюдента. При обработке материала использовали статистический пакет компьютерной программы Microsoft Excel Windows XP.

Результаты исследования и обсуждение. Заболеваемость менингококковой инфекцией в Республике Беларусь (рисунок 1) в 1995–2016 гг. находилась в пределах от 0,6 случаев на 100 тыс. в 2016 г. до 4,0 случаев на 100 тыс. населения в 1995 г. Среднемноголетний показатель составил $2,4 \pm 0,2$ на 100 тыс. В целом период характеризовался выраженной тенденцией к снижению со средним темпом прироста $-7,0\%$ ($p < 0,001$) и периодичностью 4–5,5 лет, за исключением фазы благополучия, которая началась в 2010 г. и продолжается по настоящее время (7 лет). До 2010 г. многолетняя динамика заболеваемости также характеризовалась выраженной тенденцией к снижению, но с меньшим темпом прироста: $-5,7\%$ ($p < 0,001$). Мы экстраполировали многолетнюю периодичность этого периода по отношению к линии тенденции за 1995–2009 гг. и таким образом спрогнозировали заболеваемость на 2010–2017 гг. (рисунок 1). Фактический среднемноголетний показатель заболеваемости в 2010–2016 гг. составил $1,0 \pm 0,1$ на 100 000, в то время как прогнозируемый — $1,7 \pm 0,1$ на 100 000, то есть был на 65 % ниже ($p < 0,05$). Если бы в 2010–2016 гг. сохранились те же

условия и закономерности эпидемического процесса, что и до 2010 г., то за последние 7 лет заболело бы на 447 детей больше (в среднем на 64 ежегодно). Учитывая, что средняя летальность от менингококковой инфекции по стране в 2010–2016 гг. составила 11,8 %, ежегодно умирало бы на 8 человек больше (53 за последние 7 лет).

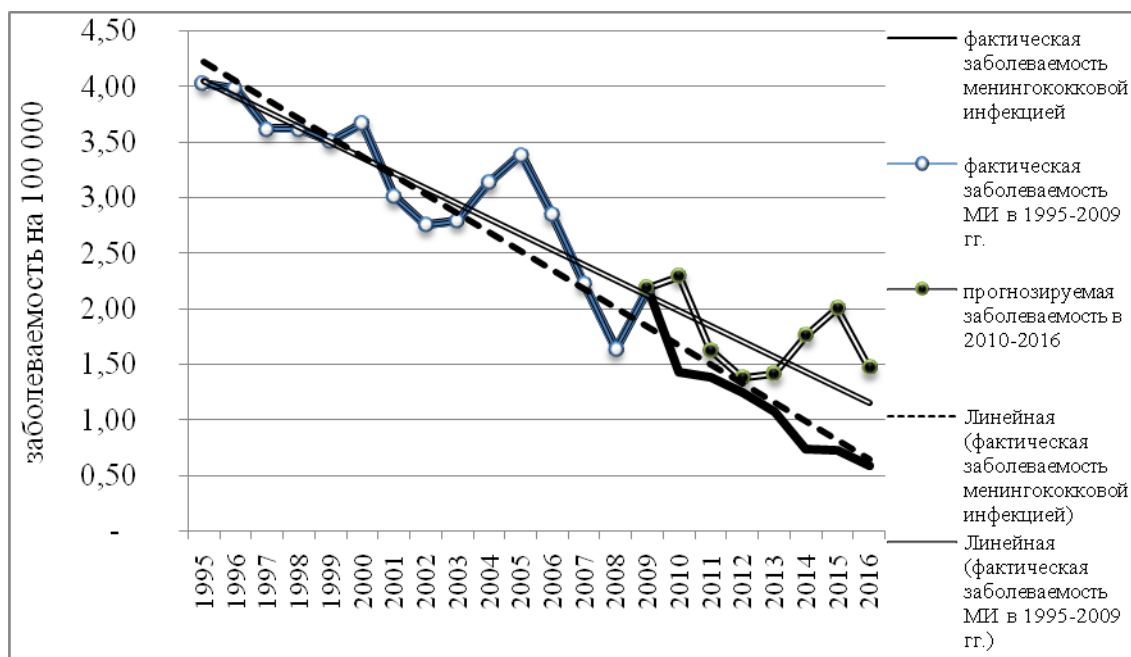


Рисунок 1. — Многолетняя динамика заболеваемости менингококковой инфекцией в Беларуси в 1995–2016 гг.

Что же изменилось за последние 7 лет? С нашей точки зрения, наиболее значимым фактором, который мог оказать влияние на эпидемическую ситуацию, явилась вакцинация против гриппа. Именно с 2009 г. начали широко использоваться субъединичные вакцины, существенно выросли охваты прививками (9,8 % в 2009 г. и менее в предшествующие годы, и от 22,7 % в 2010 г. до 40,7 % в 2016 г.), что существенно повлияло на эпидемический процесс гриппа [4]. Исследователи указывают на снижение заболеваемости не только гриппом, но и другими респираторными инфекциями [5, 6]. Что касается менингококковой инфекции, то у здоровых взрослых людей она чаще протекает в виде носительства, носителями менингококка вне подъема заболеваемости являются 10–20 % здоровых людей [1]. Вирусные инфекции, а в особенности вирус гриппа, помогают менингококку внедриться в слизистую носоглотки, делая ее рыхлой и отечной, чем способствуют развитию клинически значимых форм менингококковой инфекции. Это не может не отразиться на циркуляции менингококка, может способствовать формированию эпидемического варианта возбудителя. Нами установлена сильная обратная корреляционная связь между заболеваемостью менингококковой инфекцией в 2011–2016 гг. и охватом вакцинацией против гриппа осенью предшествующих лет (2010–2015 гг.): коэффициент корреляции составил $-0,90$ ($p < 0,001$).

Анализ заболеваемости менингококковой инфекцией в возрастных группах показал, что половину заболевших (49 %) составили наиболее восприимчивые, в силу особенностей незрелой иммунной системы, дети 0–2 лет, 30 % — лица 15 лет и старше, по 11 % и 10 % дети садового возраста и школьники (рисунок 2). Максимальной интенсивностью эпидемического процесса была среди детей 0–2 лет ($35,9 \pm 3,5$ на 100 000), заболеваемость детей 3–6 лет была в 6 раз ниже ($5,8 \pm 1,3$ на 100 000) ($p < 0,05$),

детей 7–14 лет — в 15 раз ниже ($2,4 \pm 0,5$) ($p < 0,05$), лиц 15 лет и старше — в 45 раз ниже ($0,8 \pm 0,1$ на 100 000) ($p < 0,05$) (рисунок 2).

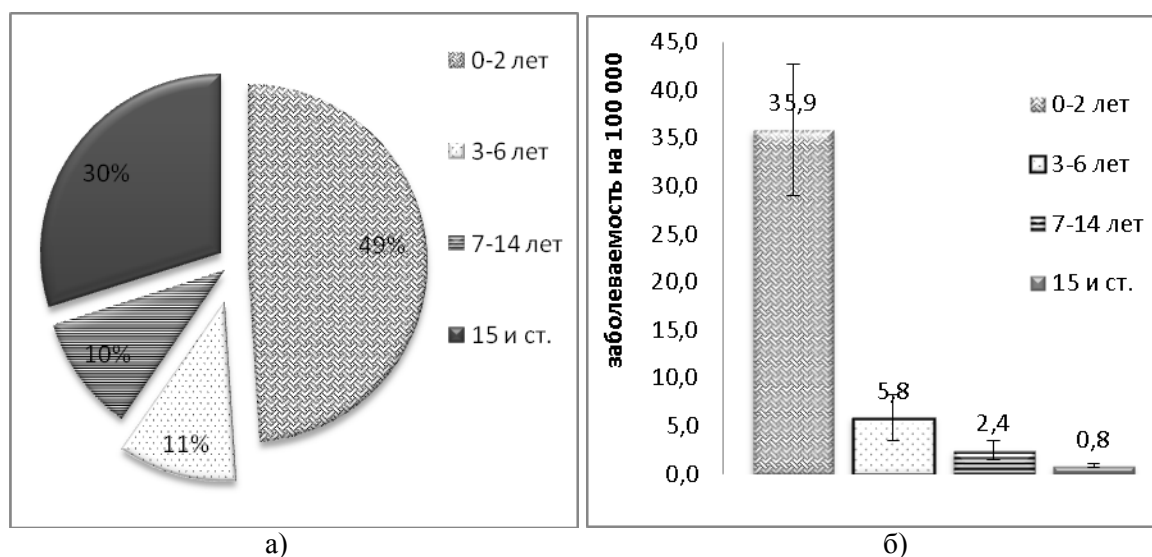


Рисунок 2. — Структура (а) и показатель заболеваемости (б) менингококковой инфекцией в Беларуси по среднемноголетним данным за 1998–2016 гг.

Для многолетней динамики заболеваемости во всех возрастных группах была характерна выраженная тенденция к снижению заболеваемости ($p < 0,001$) (рисунок 3). Средние темпы прироста составили $-7,9\%$, $-8,7\%$, $-8,7\%$, $-10,3\%$ для групп 0–2 лет, 3–6 лет, 7–14 лет и 15 лет и старше соответственно.

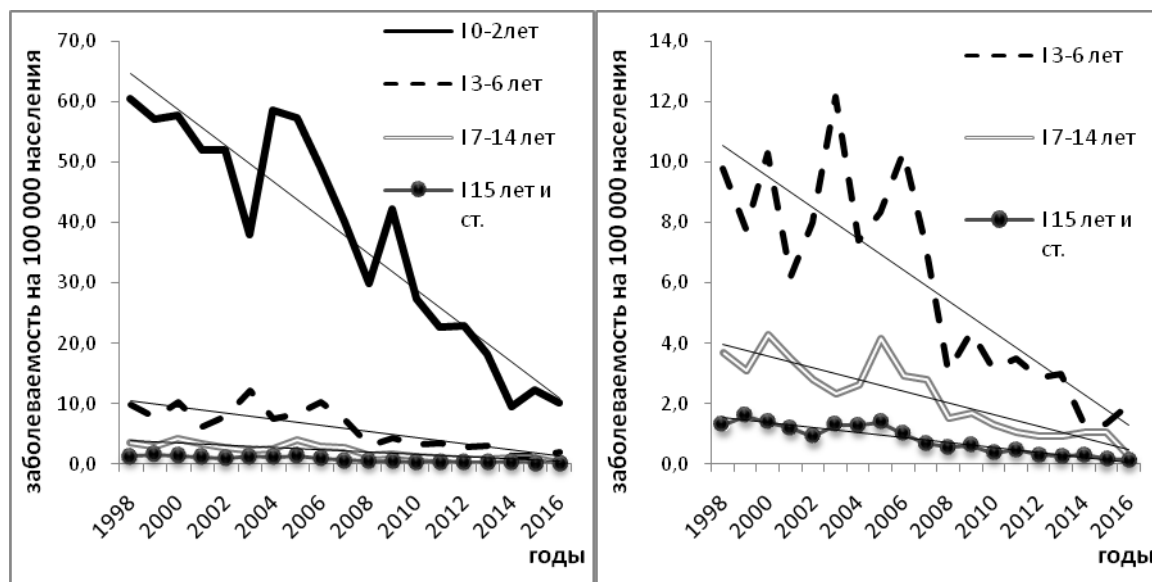


Рисунок 3. — Многолетняя динамика заболеваемости менингококковой инфекцией в возрастных группах в 1998–2016 гг.

Подъемы и снижения заболеваемости происходили синхронно в группах 0–2 лет, 7–14 лет и 15 лет и старше. Между заболеваемостью в этих группах существует сильная прямая корреляционная связь ($p < 0,001$), коэффициенты корреляции составляют от 0,90 до 0,92. Это свидетельствует о единстве эпидемического процесса

в этих группах, общих факторах, определяющих распространение менингококка в этих группах. Динамика заболеваемости детей 3–6 лет отличалась от динамики в других группах только в отдельные годы. Тем не менее, между динамикой заболеваемости детей 3–6 лет и динамиками заболеваемости в других группах установлена только умеренная корреляционная зависимость с коэффициентами корреляции от 0,48 ($p < 0,05$) (дети 0–2 лет) до 0,60 ($p < 0,001$) (7–14 и 15 лет и старше). Это говорит о наличии в этой возрастной группе дополнительных условий, влияющих на ход эпидемического процесса.

Изменение эпидемической ситуации в лучшую сторону после 2010 года отмечается во всех возрастных группах. Поскольку эпидемический процесс менингококковой инфекции является единым для всех возрастных групп, мы провели корреляционный анализ заболеваемости менингококковой инфекцией в 2011–2016 гг. и охватом прививками против гриппа всего населения осенью предыдущего года (2010–2015 гг.) и установили наличие сильной обратной связи в возрастных группах 0–2 лет (коэффициент корреляции $-0,80$ ($p < 0,05$)), 3–6 лет (коэффициент корреляции $-0,80$ ($p < 0,05$)) и 15 лет и старше (коэффициент корреляции $-0,98$ ($p < 0,001$)). В группе 7–14 лет связь была умеренной (коэффициент корреляции $-0,46$ ($p > 0,05$)). В этой группе регистрировалось минимальное абсолютное число больных менингококковой инфекцией, как весь период, так и в последние годы.

Динамика заболеваемости менингококковой инфекцией в сравнении со средним уровнем заболеваемости в республике представлена на рисунке 4. Во всех регионах многолетняя динамика заболеваемости характеризовалась выраженной тенденцией к снижению со средними темпами прироста от $-8,7\%$ в Витебской до $-18,5\%$ в г.Минске ($p < 0,001$).

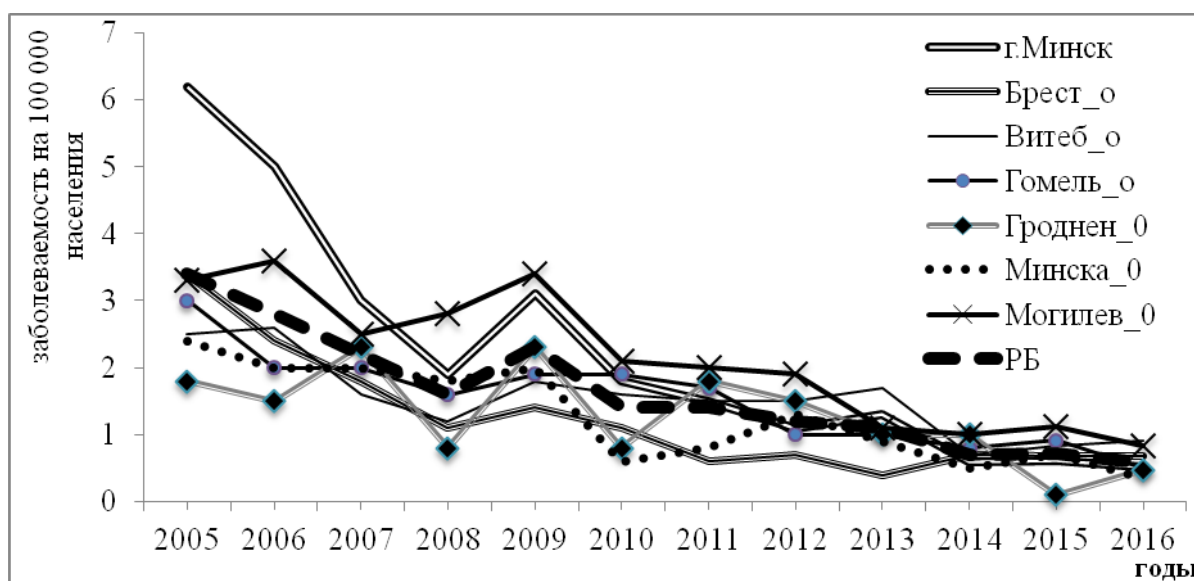


Рисунок 4. — Многолетняя динамика заболеваемости менингококковой инфекцией в регионах Республики Беларусь (2005–2016 гг.)

Так как менингококковая инфекция протекает преимущественно в форме носительства и назофарингитов, которые не имеют характерных клинических симптомов, позволяющих их дифференцировать от назофарингитов другой этиологии, в данные официальной регистрации попадают преимущественно генерализованные формы инфекции, которые составляют более 90 % случаев. В итоге небольшое число

наблюдений на отдельных территориях затрудняет статистический анализ и порой не позволяет увидеть статистически значимый результат.

До 2010 г. интенсивность эпидемического процесса менингококковой инфекцией была выше, чем в среднем по республике, в г. Минске и Могилевской области. Причем статистически значимыми различия были только в г. Минске в 2005–2006 гг., а в Могилевской области в 2009. С 2011 г. заболеваемость в этих регионах снижается и существенно ($p > 0,05$) не отличается от среднереспубликанских показателей заболеваемости. Ниже, чем в среднем по республике ($p < 0,05$), заболеваемость была в Брестской области в 2010 и 2012–2014 гг., в Гродненской — в 2006, 2007, 2010, 2015 гг., в Минской — в 2006, 2007, 2010 и 2011 гг. в остальные годы в регионах не было статистически значимых различий со среднереспубликанскими показателями заболеваемости.

Корреляционный анализ заболеваемости менингококковой инфекцией в регионах республики в 2011–2016 гг. и охватом прививками против гриппа в регионе осенью предыдущего года (2010–2015 гг.) показал наличие сильной обратной связи в г. Минске (коэффициент корреляции — $-0,856$ ($p < 0,05$)) и Могилевской области (коэффициент корреляции — $-0,89$ ($p < 0,02$)), где исходно отмечались высокие уровни заболеваемости, а также в Гродненской области (коэффициент корреляции — $-0,93$ ($p < 0,01$)). В Брестской области, где снижение заболеваемости произошло еще с 2008 г., и стабильно низкие уровни заболеваемости сохранялись весь период, увидеть связь с вакцинацией против гриппа не удалось. В Минской области связь была умеренной (коэффициент корреляции — $-0,48$ ($p < 0,01$)), в Витебской и Гомельской областях — сильной, но статистически не достоверной (коэффициенты корреляции — $-0,63$ ($p > 0,05$) и $-0,72$ ($p > 0,05$) соответственно).

Заключение. Таким образом, с 2010 г. в республике отмечается благополучная эпидемическая ситуация по менингококковой инфекции. В последние 7 лет заболеваемость ниже на 65 % ($p < 0,05$) по сравнению с прогнозируемыми показателями, предотвращено 447 случаев инфекции (64 ежегодно) и 53 летальных исхода (8 в год). Снижение заболеваемости отмечается во всех возрастных группах и всех регионах Республики Беларусь. Нами установлена сильная обратная корреляционная связь между заболеваемостью менингококковой инфекцией в 2011–2016 гг. и охватом вакцинацией против гриппа осенью предшествующих лет (2010–2015 гг.) как в целом по стране, так и на отдельных территориях, и в возрастных группах. Снижение циркуляции вируса гриппа могло препятствовать формированию эпидемических вариантов менингококков.

Литература

1. Менингококковый менингит : информ. бюлл. — 2015. — № 141 (ноябрь) [Электронный ресурс]. — ВОЗ, 2015. — Режим доступа : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/ru/>. — Дата доступа : 15.09.2017.
2. Астапов, А. А., Довнар-Запольская О.Н. Клиническая диагностика и оказание неотложной помощи при менингококковой инфекции у детей [Электронный ресурс] / А. А. Астапов, О. Н. Довнар-Запольская // Медицинский вестник. — 2016. — 23 февр. — Режим доступа : <http://www.medvestnik.by/ru/diagnose/view/klinicheskaja-diagnostika-i-okazanie-neotlozhnoj-pomoschi-pri-meningokokkovoju-infektsii-u-detej-14636-2016/>. — Дата доступа : 15.09.2017.
3. Эпидемиологическая диагностика : учебное пособие / Г. Н. Чистенко [и др.]; под ред. Чистенко Г. Н. — Минск : изд-во БГМУ, 2007. — 148 с.
4. Анализ эпидемических сезонов по гриппу в Республике Беларусь в постпандемический период / Н. В. Грибкова [и др.] // Здоровоохранение. — 2015. — № 2. — С. 10–13.

5. Гриппозные вакцины: документ по позиции ВОЗ, ноябрь 2012 года [Электронный ресурс] // Еженедельный эпидемиологический бюллетень. — 2012. — № 47 (87). — 23 ноября. — С. 461–476. — Режим доступа : http://www.who.int/immunization/position_papers/Position_paper_Influenza_vaccines_2012_Russian.pdf?ua=1. — Дата доступа : 15.08.2017.

6. Кроткова, Е. Н. Социально-экономическая значимость гриппа и ОРВИ в Гродненской области / Е. Н. Кроткова // Актуальные проблемы медицины : материалы ежегод. итог. науч.-практ. конф. — Гродно : Гродн. гос. мед. ун-т, 2017. — С. 458–462.

MENINGOCOCCAL INFECTION: THE REGULARITIES OF THE EPIDEMIC PROCESS IN AGE GROUPS AND REGIONS OF THE REPUBLIC OF BELARUS

M.I. Bandatskaya¹, E.V. Gorbacheva¹, A.M. Dronina², G.N. Chistenko¹

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;*

²*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus*

The main regularities of manifestations of the meningococcal infection epidemic process in the age groups and regions of the Republic of Belarus in 1995–2016 are described in the article. There is a strong inverse correlation between the morbidity of meningococcal infection and immunization coverage against influenza. Reduction of the circulation of the influenza virus could prevent the formation of epidemic variants of meningococci.

Keywords: meningococcus, epidemiology, morbidity, risk groups, vaccination.

Поступила 19.09.2017

ПОСЛЕДСТВИЯ ГЛОБАЛЬНОГО ПОТЕПЛЕНИЯ КЛИМАТА — ИЗМЕНЕНИЕ АРЕАЛОВ КРОВООСУЩИХ ЭКТОПАРАЗИТОВ И ПЕРЕНОСИМЫХ ИМИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ

Е.И. Бычкова¹, Е.В. Дубинина², М.М. Якович¹

¹*ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», Минск, Беларусь;*

²*Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Цель обзора — выявление особенностей функционирования популяций лесных (*Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) и таежных (*Ixodes persulcatus* Schulze, 1930) клещей в условиях глобального потепления климата и растущего антропогенного пресса на экосистемы.

Ключевые слова: изменение климата, клещевые патогены, иксодовые клещи, очаги инфекций

Введение. Техногенная эра планеты Земля, продолжающаяся в течение последних трех столетий, активно влияет на биоту, постепенно меняя состав и свойства выживающих в новых условиях популяций животных [1]. Одна из основных задач исследователей-паразитологов в настоящее время состоит в прогнозировании распространения инфекций, в частности клещевых, в условиях глобального потепления климата и техногенного загрязнения среды. Техногенные изменения связаны, прежде всего, с парниковым эффектом и выбросами в атмосферы не только CO₂, но и метана (свалки вокруг мегаполисов), и окислов азота, а также тяжелых металлов. Развитие

явления Эль-Ниньо (циркуляции атмосферы и океана в тропической части Тихого океана) еще в середине 70-х годов прошлого столетия стало необычным по сравнению с предыдущим столетием. Ученые считают, что феномен Эль-Ниньо — возможный знак появления глобального изменения климата, что делает эти изменения более частыми и интенсивными [2]. Согласно заявлению организации ВМО, в 2017 г. следует ожидать экстремальных изменений климата: продолжится череда температурных рекордов, которая началась еще в прошлом 2016 г., самом теплым за все время наблюдения. По мнению директора Всемирной программы исследований климата, Дэвида Карлсона, на планете сейчас наблюдают изменения, которые выходят за пределы понимания метеорологами климатической системы.

Глобальное потепление климата приводит к повышению температуры приземного слоя атмосферы, понижению уровня ледового щита Арктики и Антарктики и таянию льдов, таянию ледников и участвующимся сходу лавин, усиливающимся половодьям, повышению зимних температур, изменению растительного покрова и удлинению осенних теплых периодов. Все эти катаклизмы, без сомнения, оказывают влияние на состояние всей биосферы, и, прежде всего, на переносчиков возбудителей инфекций, чувствительных к любым изменениям. Смягчение климата способствует развитию кровососущих клещей и арбовирусов в кровососах, размножению грызунов-прокормителей клещей и их активности.

Предсказываемые изменения уже регистрируют на территории всего евроазиатского континента. В 2004 г. в Москве состоялся Международный семинар по оценке воздействия изменения климата на состояние здоровья населения в XXI веке. А. Н. Алексеев отмечал: «Изменения, сходные с тропическими, следует ожидать в Предкавказье и Причерноморье, а ураганы и штормы могут привести к вымыванию гумуса из тундровых почв и изменению численности и обилия птиц и мелких млекопитающих. В свою очередь это не может не отразиться на индексах прокормления в местах выплода кровососов, а неизбежное большее или меньшее изменение биомассы, производимой зелеными растениями, не могут не сказаться на условиях жизни кровососов и эктопаразитов — переносчиков возбудителей болезней» [3].

Охрана здоровья людей — основная задача человечества. Для территорий Беларуси и северо-запада России наиболее актуальны прогнозы состояния популяций комаров (переносчиков малярии) и кровососущих клещей (переносчиков клещевых инфекций). Всемирная Организация Здравоохранения объявила 2017 г. — годом борьбы с малярией и ее профилактики. Летальные исходы малярии в 2016—2017 гг. были зарегистрированы в Ленинградской, Свердловской, Самарской и Ульяновской областях и в городе Москве. В России 2017 год объявлен Годом экологии.

Клещевые инфекции выходят на первый план по их значимости для здоровья людей и напрямую связаны с состоянием переносчиков возбудителей инфекций и среды их обитания — почвой. В связи с этим необходимо обратить внимание специалистов и населения на недостаточную готовность к возможному проникновению клещевых вирусов и бактерий дальше на север и встречи с ними. Следствием климатических изменений является изменение ареалов клещей-переносчиков, состава возбудителей болезней, передаваемых ими, тем более, что ареалы основных носителей природноочаговых инфекций — двух видов рода *Ixodes* (*Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), нападающих на людей, занимают большую часть Палеарктики [1, 4].

В связи с вышеизложенным, основными задачами исследования являлось выяснение влияния глобального потепления климата на расселение и натурализацию видов-вселенцев за пределами естественных ареалов; оценка возможной интродукции южных видов переносчиков и переносимых ими возбудителей; прогнозирование

вероятности инвазий и возникновения новых очагов трансмиссивных инфекций в связи с наблюдаемыми климатическими изменениями; выявление роли перелетных птиц в возможном угасании старых и создании новых очагов болезней человека и домашних животных; воздействие изменения ареалов переносчиков и возбудителей на развитие эпизоотических процессов по пути миграций птиц.

Материалы и методы исследований. Обзор включает данные литературы и собственные материалы авторов. Использование современных возможностей исследования климатических изменений биоты по данным, получаемых со спутников Земли, позволяют определять температуру земной поверхности и влагообеспеченность растительных сообществ, наиболее благоприятных для процветания, как животных — резервуаров возбудителей болезней человека и сельскохозяйственных животных, так и переносчиков; позволяют сопоставлять накопленные экологами данные об ареалах и численности кровососущих членистоногих в различных ландшафтах и прогнозировать тенденции изменения территорий их распространения, степень опасности передаваемых ими возбудителей [5].

Исследования проводили в северо-западной (Дания, Карелия, Финляндия, Калининградская и Ленинградская области) и восточной европейской части (Республика Беларусь). Клещей собирали в природе с растительности на флаг. На территории Беларуси были исследованы голодные взрослые иксодовые клещи с растительности из 4 областей (Витебской, Гродненской, Минской, Могилевской) республики и из окрестностей города Минска. При изучении очага клещевых инфекций на территории Калининградской области (национальный парк Куршская коса, Россия) кроме обследования голодных иксодовых клещей собранных с растительности, в период весенней и осенней миграции птиц во время кольцевания также обследовали птиц на наличие кровососущих клещей. Получение материала при кольцевании птиц сильно осложняет растянутость во времени их миграций. Для видовой идентификации клещей (обычно неполовозрелые фазы), снятых с птиц, использовали праймеры определения всех известных в настоящее время видов иксодид (ПЦР с праймерами T1B и T2A, позволяющими амплифицировать родоспецифический ПЦР продукт, состоящий из 360 пар нуклеотидов в гене 12S rDNA) [6]. Для проведения видовой идентификации половозрелой фазы клещей рода *Ixodes*, собранных с растительности, использовали ПЦР-ПДРФ анализ с видоспецифическим маркером к району 5,8S–ITS2–28S генома [7]. Для исследования микроорганизмов в клещах, собранных с растительности и с птиц, были применены молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование, RLB, Real-Time PCR). Объем выборки исследованных иксодовых клещей 2 видов (*I. ricinus* и *I. persulcatus*) составил свыше 2600 экзепляров.

Результаты исследований и обсуждение. Клещевые инфекции, передаваемые при присасывании клещей рода *Ixodes*, стали в настоящее время обязательным компонентом заболевания горожан. Связано это как с удлинением периода весенне-осенней активности клещей и расширением контактов населения с природой, так и с тем, что во время сезонных миграций птицы по зеленым коридорам приносят в парковые зоны городов клещей — резервуаров инфекций [4, 8, 9].

S. E. Randolph и D. J. Rogers (Оксфордский университет) [5], анализируя многолетние климатические данные со спутников (наблюдения с 2000 г.) и работ исследователей в различных странах Европы и Балтии, предположили возможный сценарий развития природноочаговых инфекций в Западной и Восточной Европе и прогнозируют к 2020 г. значительное продвижение очагов клещевых инфекций в северо-восточном направлении [5].

Прежде всего, эти изменения касаются ареала клещей рода *Ixodes*, переносчиков вируса клещевого энцефалита (КЭ), одного из самых серьезных заболеваний людей

в евроазиатском регионе [5, 10, 11]. Иксодиды приобретают все большее значение как опасные переносчики не только КЭ, но и многих возбудителей тяжелых трансмиссивных заболеваний населения: иксодовых клещевых боррелиозов, эрлихиозов, риккетсиозов и других, причем не только моно-, но и полиинфекций [9, 12, 13]. На территории России и сопредельных стран они имеют особое значение, так как ареалы двух основных видов-переносчиков таежного (*I. persulcatus*) и лесного (*I. ricinus*) клещей частично совпадают, а ареал первого вида — простирается до побережья Тихого океана.

Имеется множество подтверждений продвижения очагов КЭ в высокие широты. Еще в 1999 г. на о. Борнхольм (Дания) был обнаружен в клещах *I. ricinus* вирус КЭ, ранее там не диагностированный [12]. Паразитологи Королевского университета ветеринарии и сельского хозяйства (устное сообщение Р.М. Jensen, 2009 г., г. Копенгаген) констатировали зараженность *I. ricinus* вирусом КЭ практически на всей территории Дании. В Финляндии на архипелаге Коккола (300 км к югу от Северного Полярного круга) был выявлен очаг с вирусом среднесибирского типа, а его переносчиком оказался таежный клещ *I. persulcatus*, принесенный туда птицами-мигрантами [14]. Эпидемиологи Архангельской области (Россия) сопоставили динамику изменений климата, используя показатели со спутников, с ростом активности иксодид и увеличением числа лиц, страдающих от нападения клещей [11]. В результате роста среднегодовых температур от -1°C в 1986 г. до $+3^{\circ}\text{C}$ в 2008 г. число лиц, отметивших присасывание клещей, составляло 60 человек на 100 000 населения в 1990 г. и 460 — в 2008 г.

По сравнению с уровнем 60-х годов прошлого века среднегодовая температура выросла на $1,2^{\circ}\text{C}$ [3]. В настоящее время уже наблюдают сдвиг более теплолюбивой растительности на северо-восток и продвижение ареалов многих переносчиков возбудителей паразитарных заболеваний в высокие широты. Так, изменение температурного режима поверхности земли в Республике Карелия, сопровождается значительными изменениями экологии клещей: наблюдается рост численности и продвижение северной границы ареала *I. persulcatus* в северо-восточном направлении, на территории ранее занятые исключительно лесным клещом *I. ricinus* [15]. Известно, что для успешного развития личинок в яйцекладке и завершения жизненного цикла таежных клещей на северной границе ареала, достаточно средне-летней температуры 20°C и относительной влажности около 87,0 %. Предполагают, что западная граница ареала таежных клещей, в том числе зараженных КЭ, может достичь побережья Ботнического залива [14]. В Ленинградской области на севере ареала *I. persulcatus* среднегодовая температура не опускается ниже $5,1^{\circ}\text{C}$, что проявляется в 2 пиках активности имаго. Однако этот феномен зависит не столько от среднегодовых температур, сколько от зимних ее показателей (в период второго осеннего пика напитавшиеся нимфы успевают завершить метаморфоз в текущем году).

На западе и юго-западе ареала в Балтии и Беларуси таежный клещ встречается sporadически. И. Т. Арзамасовым [16] отмечалось, что на территории Беларуси таежные клещи регистрировали в центральной части, занятой хвойными и широколиственно-хвойными лесами, где, по мнению автора, имеются биотопы, экологически близкие к таежным, свойственные для данного вида. В настоящее время молекулярно-генетическими исследованиями на территории Беларуси подтверждено обитание в северной зоне Беларуси (в 5 районах Витебской области: Витебский, Докшицкий, Шумилинский, Лепельский, Полоцкий районы) иксодовых клещей вида *I. persulcatus*. Кроме того, были выявлены гибридные особи, которые содержали фрагмент ДНК, характерный как для *I. ricinus*, так и для *I. persulcatus* [7, 17].

При исследованиях, проведенных в рамках совместного проекта Швеции–России–Беларуси–Эстонии «Прогноз риска заболеваемости смешанными клещевыми инфекциями вследствие увеличения антропогенного пресса» в 2010 г. вирус КЭ был выделен из иксодовых клещей, собранных в Нарочанском регионе, Чериковском и Минском районах Беларуси. Наиболее высокая его концентрация ($Gt=32,9$) была отмечена в клещах из мегаполиса Минска [1]. Основным переносчиком клещевых инфекций на большей части территории Беларуси является *I. ricinus* [10]. На Куршской косе вирус КЭ также неоднократно выделяли из *I. ricinus*, собранных в природе, снятых с людей и из нимф, с пролетных птиц. Зараженность вирусом КЭ таежных клещей *I. persulcatus* в окрестностях Санкт-Петербурга низка, варьирует по годам от 0,9 до 1,5 % [12, 18].

Набор клещевых, патогенных для человека, микроорганизмов более или менее одинаков на протяжении всего ареала обоих видов рода *Ixodes*: 3 субтипа вирус КЭ: дальневосточного, западноевропейского и сибирского, бактерии сем. Spirochetaceae 4–5 видов боррелий: *Borrelia afzelii* — возбудитель атрофирующего акродерматита, *Borrelia garinii* — возбудитель нейроборрелиоз, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* — возбудитель собственно болезни Лайма, а также *Borrelia lusitaniae* (известна ранее только из Португалии) и *Borrelia valaisiana* (поначалу считавшаяся условно патогенной); бактерии группы Rickettsiales: 2 вида эрлихий *Ehrlichia muris* — возбудитель моноцитарного и *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* — возбудитель гранулоцитарного эрлихиозов; простейших группы Piroplasmidae — *Babesia microti* — возбудитель бабезиоза человека [12]. В ряду других клещевых инфекций человека есть и такое особо опасное заболевание, как туляремия. Далеко не все возбудители клещевых инфекций могут быть одновременно встречены во время обследования территорий. Так, исследование иксодид, проведенное в Беларуси в 2008–2010 гг., выявили бабезий только в клещах Нарочанского региона и в окрестностях города Минска [1, 4].

Генетическая неоднородность аллопатрических популяций видов рода *Ixodes* на северо-западе (популяции *I. ricinus* в Беларуси и на Куршской косе в России и популяции *I. persulcatus* в Ленинградской области) проявляется больше всего в клещах по составу возбудителей боррелиозов [13, 19].

Показано, что естественная зараженность клещей боррелиями определяется практически на всей территории Беларуси [20–22]. В различных природных очагах она варьирует от 1,5 до 75,0 %, в среднем — 33,2 %. Наблюдается увеличение (более чем в два раза) зараженности имаго *I. ricinus* спирохетами комплекса *B. burgdorferi sensu lato* в осенний период, по сравнению с весной [7, 23]. При посевах содержимого кишечника клещей на питательную среду BSK-H (Sigma) было выделено 35 изолятов; генотипирование 11 из них показало: 6 изолятов *B. garinii*, 5 — *B. afzelii*, 1 — *B. burgdorferi s.s.* в сочетании с одним из указанных. *Borrelia burgdorferi s.s.*, по последним данным, на территории северо-запада России находят в клещах только совместно с другими клещевыми патогенами [12, 13].

Многолетние исследования около 2 тыс. самок и самцов *I. ricinus* на Куршской косе способствовало составлению картины доминирующих там возбудителей патогенных для человека микроорганизмами в очаге клещевых инфекций: число двойных инфекций составило 37,0 %, тройных — более 5,0 %, что подтверждает положение о множественном заражении переносчиков клещевыми инфекциями в очагах. С момента установления роли *I. persulcatus* в качестве переносчика боррелий все больше внимания уделяют смешанным инфекциям, поскольку ареалы КЭ, боррелиоза, эрлихиоза и бабезиоза совпадают.

Наблюдаемое смещение ареала таежного клеща в северо-восточном направлении неизменно приведет с течением времени к колебаниям не только уровня зараженности клещей боррелиями, но и их видового состава, а также генотипическому его разнообразию в популяциях клещей на разных территориях [13, 19], что, по всей вероятности, обуславливает гетерогенность популяций самих переносчиков [12]. Было показано, что *B. lusitaniae* и *B. valaisiana* практически встречаются только в смешанных инфекциях, либо с *B. garinii*, либо с *B. afzelii*. Неоднородность проявляется также в доминировании различных видов возбудителей в популяции клещей в разные отрезки сезона. Сказывается еще один показатель — скорость движения (т.е. частота наползания на человека) особей, незараженных и зараженных различными видами патогенов. Использование оригинальной методики расчета индекса двигательной активности клещей (ИДА) позволило выявить характер зараженности хозяина-переносчика на способность быть им [18]. Исследование таежных клещей из окрестностей Санкт-Петербурга, собранных в июне месяце (время наибольшей активности *I. persulcatus*), показало, что большую активность проявляют особи, зараженные возбудителями нейроинфекций: ИДА клещей, зараженных и вирусом КЭ, и возбудителем нейроборрелиоза *B. garinii* равен 27,5 см/мин. Такие показатели для особей со смешанной инфекцией *B. afzelii* и *B. garinii* соответствуют 24,6 см/мин., для особей зараженных только *B. garinii* — 22,3, зараженных исключительно *B. afzelii* — 22,0, а незараженных клещей — 20,3. Полученные результаты свидетельствуют об особой опасности наличия на территории клещей, зараженных возбудителем нейроборрелиоза: сочетание *B. garinii* с нейровирусом существенно утяжеляет течение клещевого энцефалита. В. А. Семенов и А. В. Субботин [19] связали двухволновый характер КЭ именно с наличием дополнительного инфекционного агента. Особенно это важно в городах, где данная форма боррелиоза встречается чаще и клещи, зараженные ею, активизируются раньше при более высокой (нежели в пригородах) городской температуре внешней среды [24]. Кроме того, эти очаги активно поддерживают перелетные птицы.

Многолетние исследования английских ученых [5] по изучению влияния изменения климата на состояние переносчиков касаются как Европы (предмет их особого внимания), так и других районов Палеарктики. Глобальное потепление раздвигает границы возможного развития переносчиков КЭ, возрастает число находок *I. persulcatus* в зонах их неустойчивого развития. На востоке России, например, в Республике Саха (Якутия), много севернее ареала, «разрешенного» тепловым барьером для развития этого вида, констатируют ежегодные случаи нападения таежных клещей на людей. По личному сообщению профессора Г. А. Данчиновой: «Пока нельзя говорить о существовании устойчивой популяции таежных клещей на данной территории, однако, наблюдаемое значительное потепление, может сделать Якутию районом эндемичным по клещевым инфекциям» («Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, г. Иркутск).

В распространении возбудителей инфекций по земному шару огромную роль играют перелетные птицы, большую, чем миграция населения. Птицы, будучи резервуарами возбудителей заболеваний различной природы (вирусной, бактериальной, грибковой, протозойной), могут и не страдать от этих микроорганизмов. Мигрирующие птицы транспортируют эктопаразитов — переносчиков возбудителей многих арбовирусов, поражающих животных и человека. В этом отношении особое значение имеют иксодовые клещи, ареал которых, как уже было упомянуто, занимает почти всю территорию евроазиатской части Палеарктики, а глобальное потепление расширяет границы их распространения на север. Обнаружение очага КЭ с вирусом среднесибирского типа и переносчиком таежным клещом в Финляндии [14]; занос на

север, практически к самому Северному полярному кругу, на Фарерские острова (61°26' — 62°25' с. ш.) возбудителя клещевого боррелиоза *B. garinii* подтверждают данный вывод. Причем, по мнению авторов, в этом случае нимфы *I. ricinus*, зараженные боррелиями, прибыли, по-видимому, из Англии, где появление новой инфекции произошло со сменой и позвоночного хозяина (другого вида птицы), и переносчика — (другого вида иксодового клеща), получившего возбудителя при совместном питании с прибывшими, зараженными *I. ricinus* [25].

Проблема клещевых инфекций становится все более актуальной в связи с интенсивным заносом паразитирующих на птицах кровососущих членистоногих: смещение ареалов птиц, их несущих, в северные районы, способствует выживанию и размножению не только самих переносчиков, но и завершению цикла развития клещевых возбудителей в них, являясь причиной инвазий возбудителей. Отмечено, что на Куршской косе птицы, летящие на север во время весенней миграции, в 3,0 % заражены тремя видами возбудителей рода *Borrelia*, тогда как птицы, возвратившиеся осенью, имели 18,8 % клещей, зараженных только *B. garinii*. Такие же данные были получены при изучении птиц на миграционных маршрутах в Скандинавии: только один вид боррелий — *B. garinii* обнаруживали в клещах на птицах летящих осенью. Число случаев заражения (3,0 % к 18,8 %), а также обнаружение в клещах только одного вида боррелий — *B. garinii*, характерно в основном для более теплого климата городов [24]. Можно предположить, что клещевые возбудители в птицах, возвращающихся с севера, имеют иное, скандинавское происхождение и могут содержать новые приобретенные там вирулентные штаммы возбудителей.

Результаты многолетних исследований (около 15 лет) очагов клещевых инфекций на территории национального парка в Калининградской области позволили установить процессы, которые наблюдают на Куршской косе в фауне клещей-переносчиков и возбудителей инфекций в течение всего времени [9]. Работы проводили на Орнитологической станции Зоологического института РАН, месте нахождения ловушек для кольцевания птиц. Кроме сбора клещей *I. ricinus* (единственного переносчика клещевых инфекций в регионе) с растительности на флаг в период весеннего и осеннего пиков активности этого вида, в периоды 2000–2001 и 2008–2010 гг. были начаты исследования клещей, снятых с птиц во время кольцевания [9]. Птицы несут и прокармливают исключительно нимф и личинок иксодовых клещей. Клещей собирали в период весенних и осенних миграций только своробьиных птиц-наземников, которые при питании на земле могут иметь контакт с местной фауной, а совместное питание на хозяине способствует обмену возбудителями в обе стороны. Определение видовой принадлежности всех снятых с птиц клещей проводили, как уже было упомянуто, молекулярно-генетическими методами.

Значительную роль птиц в циркуляции возбудителей, патогенных для человека, на территории Куршской косы, свидетельствуют, прежде всего, находки вируса КЭ в клещах, снятых с птиц. Их роль в поддержании природного очага вируса нашло так же отражение в наблюдаемом росте зараженных голодных *I. ricinus*, собранных с растительности: 0,7 % в 1998 г. и 1,5 % в 2005 г. В отношении зараженности иксодовых клещей боррелиями наблюдается иная картина: снижение зараженности клещей, собранных с растительности, и снижение зараженных боррелиями неполовозрелых клещей, приносимых птицами весной (92,98 % в 2000 г., 40,6 % в 2008 г.).

Более того, в клещах, собранных с пролетных птиц весной, были обнаружены новые, не встречавшиеся ранее в регионе патогенные возбудители: риккетсии рода *Rickettsia* (способные вызывать у людей лихорадки) и простейшие *Babesia venatorum* (возбудители бабезиоза сельскохозяйственных животных). Работы последних лет позволили констатировать не только снижение зараженности боррелиями клещей,

снимаемых с птиц, но и возросшую встречаемость в них других внутриклеточных бактерий — риккетсий, приносимых с юга, и до недавнего времени не встречавшихся так далеко на север. Этими видами были *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, и даже экзотический для северо-запада России вид — *Rickettsia japonica*.

Такое разнообразие возбудителей, которых несут птицы, требует внимательного отношения к возможным заболеваниям смешанной этиологии у людей. В последние годы все чаще стали отмечать бабезиоз человека со «смешанной» клиникой (чаще всего с клещевым энцефалитом или боррелиозом [12, 19]. Наличие смешанных инфекций энцефалитно-боррелиозно-бабезиозных — вопрос времени и точности молекулярной диагностики.

Инвазия новых видов клещевых патогенов связана, по-видимому, не только с зараженностью клещей *I. ricinus* при питании их на перелетных птицах-наземниках, но и с заносом птицами новых видов кровососущих иксодид, не свойственных таким высоким широтам как Куршская коса (55°09' с. ш. 20°51' в. д.). Именно смягчение климата способствовало проникновению видов южных кровососущих клещей на север. В 2008 г. на Куршской косе впервые были обнаружены при осмотре дроздов два новых для этого региона вида *Hyalomma marginatum marginatum* Koch, 1844 и *Ixodes frontalis* Panzer, 1798. Имеются данные обнаружения *I. frontalis* также на севере в 2005 г. на территории Финляндии.

Средиземноморский вид *H. m. marginatum* (единственный вид этого рода в Европе) встречается на территории современной России в ряде южных регионов бывшего СССР. Вид был собран с черного дрозда. Взрослых клещей, питающихся на диких копытных животных и на скоте, в 5,0 % случаев встречают присосавшимися к людям. Все фазы развития обнаруженного вида *I. frontalis* питаются и разносятся исключительно птицами; в России его находили в Предкавказье и Ставропольском крае.

Взрослые клещи *H. m. marginatum* — основные переносчики вируса геморрагической лихорадки Крым-Конго (ККГЛ); личинки и нимфы прокармливаются преимущественно на врановых птицах семейства Corvidae — основных резервуарах этого вируса. Исследования 2004 г. показали, что вирус ККГЛ и заболеваемость данным типом лихорадки продвигаются в связи с потеплением климата на север со скоростью 10–60 км в год. В 2016 г. случаи заболевания ККГЛ были зарегистрированы в Ростовской области. Высокая биологическая пластичность *H. m. marginatum*, а также одновременная встреча его и *I. frontalis* (ареал, которого заметно расширяется) на тех же птицах во время весеннего пролета над территорией Калининградской области требуют особого внимания. Более того, особенность развития *H. m. marginatum* делают этот вид опасным из-за возможной акклиматизации зараженных клещей и созданию новых очагов клещевых инфекций, тем более, что оба встреченных на Куршской косе новых вида были заражены *Rickettsia aeschlimannii*, патогенной для людей [8]. Наблюдаемое глобальное потепление дает возможность акклиматизации обоих видов и превращению случайного заноса этих переносчиков в состоявшуюся натурализацию.

Личинки *I. frontalis*, питаясь на грачах совместно с линяющими на птицах клещами *H. m. marginatum*, могут получить от них возбудителей, а нимфы *I. frontalis*, сменив птицу-прокормителя, могут оказаться донором патогена ККГЛ для доминирующего на Куршской косе вида *I. ricinus* при их совместном питании [11, 25]. Такой путь обмена не исключен, а круг птиц-прокормителей обоих видов очень широк. Вероятность такого сценария, однако, мала: данные кольцевания черных дроздов указывают на то, что, в большинстве случаев, они летят с юго-запада Европы.

Заключение. Проведенные исследования показали, что изменение ареалов кровососущих эктопаразитов и переносимых ими возбудителей болезней является

последствием глобального потепления климата. Исходя из приведенных данных, сдвиг южных границ ареалов КЭ и боррелиозов к северу обусловлен изменениями структуры растительных покровов и увеличением сухости у южных границ ареалов этих переносчиков. Границы разрешенного развития переносчика КЭ в горных районах сдвигаются вверх, и его очаги встречаются на большей высоте. Рост температур увеличивает время нападения зараженных клещей на человека. Наблюдается наступление более теплолюбивого *I. ricinus* с преобладанием в нем видов боррелий, либо расширение симпатричных территорий, а также отеснение *I. persulcatus* (переносчика серьезных клещевых инфекций) на северо-восток в сравнительно слабо населенные районы России. Продвижение в том же направлении лесного клеща *I. ricinus* — носителя менее опасных патогенов (прежде всего штаммов КЭ) имеет некоторое положительное значение для ситуации по клещевым инфекциям [4, 8, 12].

Следует подчеркнуть, что инвазия новых видов клещевых патогенов связана, по-видимому, не только с зараженностью ими клещей *I. ricinus*, но и с заносом птицами новых видов кровососущих иксодид. Именно смягчение климата способствовало проникновению видов южных кровососущих клещей *Hyalomma marginatum marginatum* Koch, 1844 и *Ixodes frontalis* Panzer, 1798 на север и, вполне возможно, будет способствовать превращению случайного заноса этих переносчиков в их натурализацию. Под влиянием потепления климата и усиления загрязнения среды появятся новые популяции существующих видов переносчиков с новыми измененными свойствами. Изучение возбудителей болезней человека и животных, их взаимодействия с хозяевами, между собой и с другими компонентами паразитоценоза, имеет не только общебиологический, теоретический, но и чисто практический интерес (определение опасности очагов трансмиссивных болезней, как человека, так и, важных для его выживания домашних животных, а также компонентов биоты вообще).

Литература

1. Особенности популяций и паразитофауны клещей рода *Ixodes* — переносчиков болезней в Беларуси и на северо-западе России / А. Н. Алексеев [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / под ред. проф. Г. М. Игнатъева. — Минск : РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2010. — Вып. 3. — С. 90–93.
2. Всемирная метеорологическая организация (ВМО) [Электронный ресурс] / World Meteorological Organization (WMO). — 2017. — Режим доступа: <http://public.wmo.int/ru>. — Дата доступа: 01.09.2017.
3. Алексеев, А. Н. Возможные последствия вероятного глобального потепления климата для распространения кровососущих эктопаразитов и передаваемых ими патогенов / А. Н. Алексеев // Изменение климата и здоровье населения России в XXI веке: сб. материалов Междунар. семинара, 5–6 апр. 2004 г. — М., 2004. — С. 67–79.
4. Очаги клещевых инфекций в урбаноценозах и роль птиц в их изменениях и поддержании / А. Н. Алексеев [и др.] // Паразиты Голарктики: сб. науч. статей Междунар. симп. — Петрозаводск, 2010. — Т. 1. — С. 4–8.
5. Randolph, S. E. Tick-borne disease systems: mapping geographic and phylogenetic space / S. E. Randolph, D. J. Rogers // Adv. Parasitol. — 2006. — Vol. 62. — P. 263–291.
6. Beati, L. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters / L. Beati, J. E. Keirans // J. Parasitol. — 2001. — Vol. 87, No. 1. — P. 32–48.
7. Бычкова, Е. И. Иксодовые клещи (*Ixodidae*) в условиях Беларуси / Е. И. Бычкова, И. А. Федорова, М. М. Якович. — Минск: Беларус. навука, 2015. — 191 с.
8. Распространение клещевых инфекций как функция системы «клещи—перелетные птицы—возбудители болезней» / А. Н. Алексеев [и др.] // Современные проблемы

инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2009. — Вып. 2. — С. 31–36.

9. Дубинина, Е. В. Глобальное потепление климата, изменение ареалов переносчиков, появление видов-вселенцев и переносимых ими возбудителей болезней / Е. В. Дубинина. — Пест-Менеджмент (РЭТ-инфо). — 2017. — № 1. — С. 14–24.

10. Вотьяков, В. И. Клещевые энцефалиты Евразии: вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции / В. И. Вотьяков, В. И. Злобин, Н. П. Мишаева. — Новосибирск, 2002. — 438 с.

11. Тронин, А. А. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в Северо-западном федеральном округе России. Аналитический обзор / А. А. Тронин. — СПб., 2008. — 120 с.

12. Алексеев, А. Н. Функционирование паразитарной системы «клещ—возбудитель» в условиях антропогенного пресса / А. Н. Алексеев, Е. В. Дубинина, О. В. Юшкова. — СПб., 2008. — 147 с.

13. Коренберг, Э. И. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке / Э. И. Коренберг. — М.: Медицина, 2006. — С. 376–386.

14. First report on tick-borne pathogens and exoskeleton anomalies in *Ixodes persulcatus* Schulze ticks (*Acarina: Ixodidae*) collected in Kokkola coastal region, Finland / A. N. Alekseev [et al.] // *Int. J. Acarol.* — 2007. — Vol. 33, No. 3. — P. 253–258.

15. Карганова, Г. Г. Клещи как фактор микроэволюции вируса клещевого энцефалита / Г. Г. Карганова // *Паразитология в XXI веке — проблемы, методы, решения: материалы IV Всерос. съезда паразитол. о-ва при РАН.* — СПб., 2008. — Т. 2. — С. 23–27.

16. Арзамасов, И. Т. Иксодовые клещи / И. Т. Арзамасов. — Минск: АН БССР, 1961. — 132 с.

17. К вопросу о фауне клещей рода *Ixodes* на территории Республики Беларусь / Е. И. Бычкова [и др.] // *Проблемы экологии.* — Иркутск: Изд-во гос. ун-та, 2010. — С. 317.

18. Алексеев, А. Н. Кровососущие членистоногие в паразитарной системе. Механизмы защиты и агрессии переносчиков возбудителей болезней / А. Н. Алексеев. — СПб., 2008. — 56 с.

19. Семенов, В. А. К вопросу об этиологии клещевого энцефалита с двухволновым течением / В. А. Семенов, А. В. Субботин // *Эпидемиологическая обстановка и стратегия борьбы с клещевым энцефалитом на современном этапе: материалы расшир. пленума пробл. комиссии «Клещевой и другие вирусные энцефалиты» РАМН, Москва, 9–10 дек. 2003 г.* — М., 2003. — С. 20–21.

20. Зараженность иксодовых клещей Гродненской области патогенными для человека возбудителями инфекций / Н. П. Мишаева [и др.] // *Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики паразитарных заболеваний* / под ред. проф. В. Я. Бекиша. — Витебск: ВГМУ, 2012. — С. 129–131.

21. 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.

22. Оценка видового состава, численности и степени зараженности иксодовых клещей спирохетами комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. на урбанизированных территориях Минской области / О. Р. Князева [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* — 2014. — № 1. — С. 111–115.

23. Федорова, И. А. Сезонные изменения зараженности имаго *Ixodes ricinus* (L.) возбудителями клещевого боррелиоза в условиях урбанизации / И. А. Федорова // *Зоологические чтения.* — Гродно, 2013. — С. 296–299.

24. Мовилэ, А. Генетическое разнообразие иксодовых клещей *Ixodes ricinus* (L.) и трансмиссивных микроорганизмов в очагах Республики Молдова: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 / А. Мовилэ. — Кишинэу, 2008. — 25 с.

25. Dubinina, N. V. The role of migratory passerine birds in pathogen exchange between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (*Acarina, Ixodidae*) / N. V. Dubinina, A. N. Alekseev // *Acarina.* — 2003. — Vol. 11, No. 1. — P. 99–104.

CHANGING DISTRIBUTION OF BLOOD-SUCKING ECTOPARASITES AND THEIR PATHOGENS AS CONSEQUENCES OF GLOBAL CLIMATE WARMING

E. I. Bychkova¹, H. V. Dubinina², M. M. Yakovich¹

¹*State Scientific and Production Amalgamation «The Scientific and Practical Center National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources», Minsk, Belarus;*

²*Zoological Institute of Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia*

The review aims to: identify of features of the functioning of forest tick (*Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) and taiga tick (*Ixodes persulcatus* Schulze, 1930) populations under the conditions of global climate warming and growing anthropogenic impact on the ecosystems.

Keywords: global climate warming, tick-borne pathogens, *Ixodes* tick, natural infection foci.

Поступила 15.09.2017

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ ПРОТИВ ГРИППА

*В.С. Высоцкая¹, И.Н. Глинская¹, И.А. Карaban², В.В. Пашкович¹, В.В. Гринь¹,
Н.П. Шмелева³, Н.В. Грибкова³*

¹*ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
Минск, Беларусь;*

²*Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь;*

³*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь*

Резюме. В течение 2008–2010 гг. — периода низких уровней охвата населения профилактическими прививками против гриппа (от 7,8 % до 10,7 %), показатели заболеваемости колебались от 3780,1 до 2031,1 на 100 тысяч населения. С 2011 г., когда охват профилактическими прививками населения страны планомерно увеличивался и достиг в последние годы 40 %, заболеваемость гриппом колебалась в диапазоне от 1,3 до 537,8 на 100 тысяч населения. Тенденция к снижению заболеваемости гриппом в Республике Беларусь могла быть обусловлена уровнем коллективного иммунитета, широким проведением профилактических мероприятий, в том числе противогриппозной вакцинацией и относительно продолжительной циркуляцией близкородственных дрейфовых штаммов вирусов гриппа.

Ключевые слова: грипп, вакцинопрофилактика, эффективность вакцинопрофилактики.

Введение. Разные уровни заболеваемости отдельными инфекционными болезнями и величина наносимого ими экономического ущерба, а также размеры суммарных затрат системы здравоохранения требуют концентрации усилий, в первую очередь, на приоритетных направлениях. Одним из таких направлений продолжает оставаться профилактика гриппа.

В мире грипп продолжает оставаться наиболее массовым заболеванием, являясь инфекцией, вызывающей периодические подъемы (в т. ч. эпидемии и пандемии),

охватывающие до 20–30 % детей и до 5–10 % взрослых. Как минимум в 2 % случаев, а у детей в 5–10 % случаев, грипп требует стационарного лечения, провоцируя в дальнейшем у 4–11 % госпитализированных пациентов развитие осложнений, которые могут приводить к летальному исходу. Ежегодные подъемы заболеваемости гриппом сопровождаются смертью от 250 до 500 тысяч человек во все мире [1–4].

По разным оценкам, ущерб государства от одного случая заболевания острой респираторной инфекцией (далее — ОРИ), в т. ч. гриппом, составляет приблизительно 150–280 долларов США (далее — доллар), а для каждого заболевшего — от 15 до 100 долларов, в зависимости от тяжести течения заболевания [5, 6]. По данным литературы в период эпидемий гриппа на предприятиях могут отсутствовать до 40 % сотрудников, в связи с чем на «непрямые» потери приходится до 70–80 % общих экономических потерь [7].

В структуре регистрируемых в Республике Беларусь инфекционных заболеваний (ежегодно более 3,3 миллионов случаев) на долю ОРИ и гриппа приходится около 97 %. В периоды ежегодных эпидемических подъемов вирусы гриппа поражают от 5 до 10 % совокупного населения контрольных городов [8].

Среди существующих средств профилактики гриппа вакцинопрофилактика является научно обоснованной, экономически целесообразной и социально оправданной стратегией предупреждения и снижения заболеваемости гриппом [9, 10].

Цель работы — оценка эффективности и экономической целесообразности вакцинопрофилактики гриппа по итогам сезона заболеваемости 2016–2017 гг.

Материалы и методы. Оценка уровней заболеваемости и охвата профилактическими прививками против гриппа населения в целом и его отдельных групп проводилась на основании данных форм государственной статистической отчетности «Отчет об отдельных инфекционных, паразитарных заболеваниях и их носителях» (Форма 12–инфекции (Минздрав)), «Отчет о проведенных профилактических прививках» (Форма 2–прививки (Минздрав)), отчетных форм, ежегодно утверждаемых приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь на период проведения кампании вакцинации против гриппа, а также листов нетрудоспособности.

Обработка данных и анализ результатов проводились с использованием стандартных методов эпидемиологической диагностики: ретроспективный эпидемиологический анализ, описательно-оценочные методы, статистический метод [11].

Расчет экономической целесообразности проведенной вакцинации против гриппа и затрат, предотвращенных в связи с вакцинопрофилактикой проведен на основании общепринятой методики [12].

Результаты и обсуждение. В октябре-ноябре 2016 г. проведена кампания вакцинации против гриппа, по результатам которой защиту от гриппа получило 40,7 % населения Республики Беларусь (более 3,8 миллиона человек). В том числе привито более 1,78 миллиона пациентов из группы высокого риска возникновения неблагоприятных последствий заболевания гриппом и более 1,31 миллиона пациентов из группы высокого риска заражения гриппом, что составило 75 % от численности этого контингента и соответствует рекомендациям ВОЗ. Для вакцинации населения применялись живая («Ультавак[®]») и инактивированные (субъединичные «Гриппол плюс-белмед», «Инфлювак[®]»; сплит-вакцина «Ваксигрип») противогриппозные вакцины.

Анализ данных о заболеваемости гриппом среди привитого и не привитого населения в эпидемический период активизации респираторных вирусов в 2017 г. показал высокую эффективность проведенной иммунизации против гриппа, о чем свидетельствуют рассчитанные индекс и коэффициент эффективности, составившие

14,3 и 93,0 соответственно. При этом достоверных отличий противоэпидемической эффективности использованных для вакцинопрофилактики гриппа противогриппозных вакцин не отмечено.

В последнее десятилетие для вакцинопрофилактики гриппа использовались противогриппозные вакцины с близким штаммовым составом, что свидетельствует о циркуляции близкородственных вирусов гриппа [13–15]. В связи с этим отмечающаяся тенденция к снижению заболеваемости гриппом может быть связана с рядом причин: состоянием коллективного иммунитета, широким проведением ряда профилактических мероприятий, в том числе противогриппозной вакцинации и относительно продолжительной циркуляцией близкородственных дрейфовых штаммов вирусов гриппа (рисунок 1). Так, если в эпидемическом сезоне 2008–2009 гг., когда охвачено профилактическими прививками было 7,8 % населения, заболеваемость гриппом составила 3780,1 случаев на 100 тысяч населения (заболело более 357 тысяч человек), то в эпидемическом сезоне 2016–2017 гг., при охвате прививками 40,7 % населения, показатель заболеваемости гриппом составил 27,2 случая на 100 тысяч населения (заболело 2575 человек) (рисунок 1, 2).

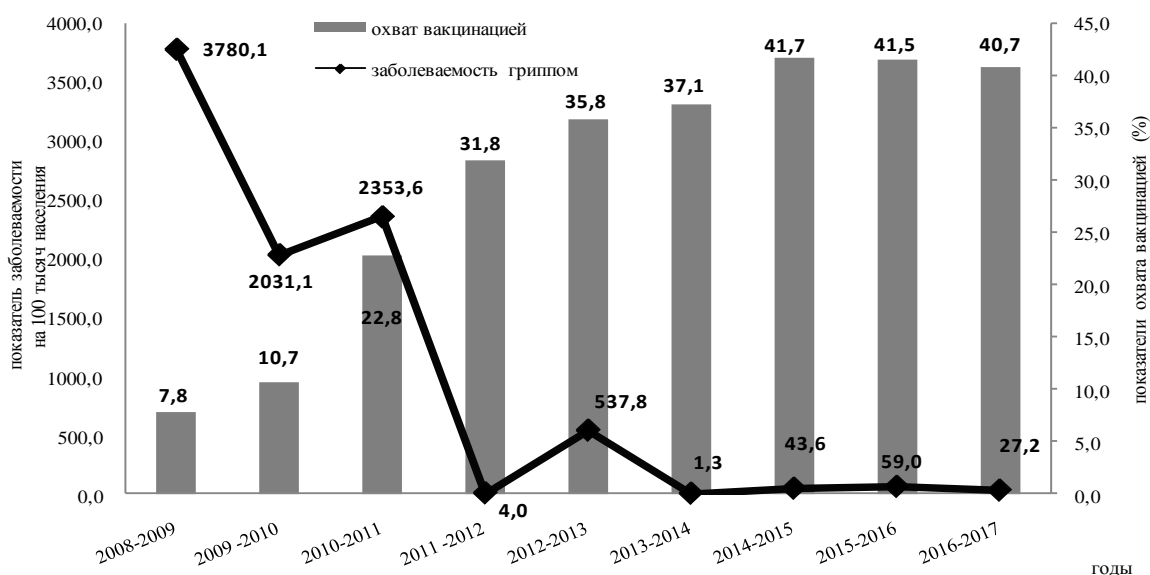


Рисунок 1. — Динамика заболеваемости гриппом и охвата вакцинацией против гриппа населения в Республике Беларусь за 2008–2017 гг.

Проведенная вакцинация позволила в сезон заболеваемости 2016–2017 гг. предупредить более 144,8 тысяч случаев гриппа (в том числе, более 17 тысяч случаев осложненных форм) и более 200 тысяч случаев ОРИ негриппозной этиологии (рисунок 2, 2а).

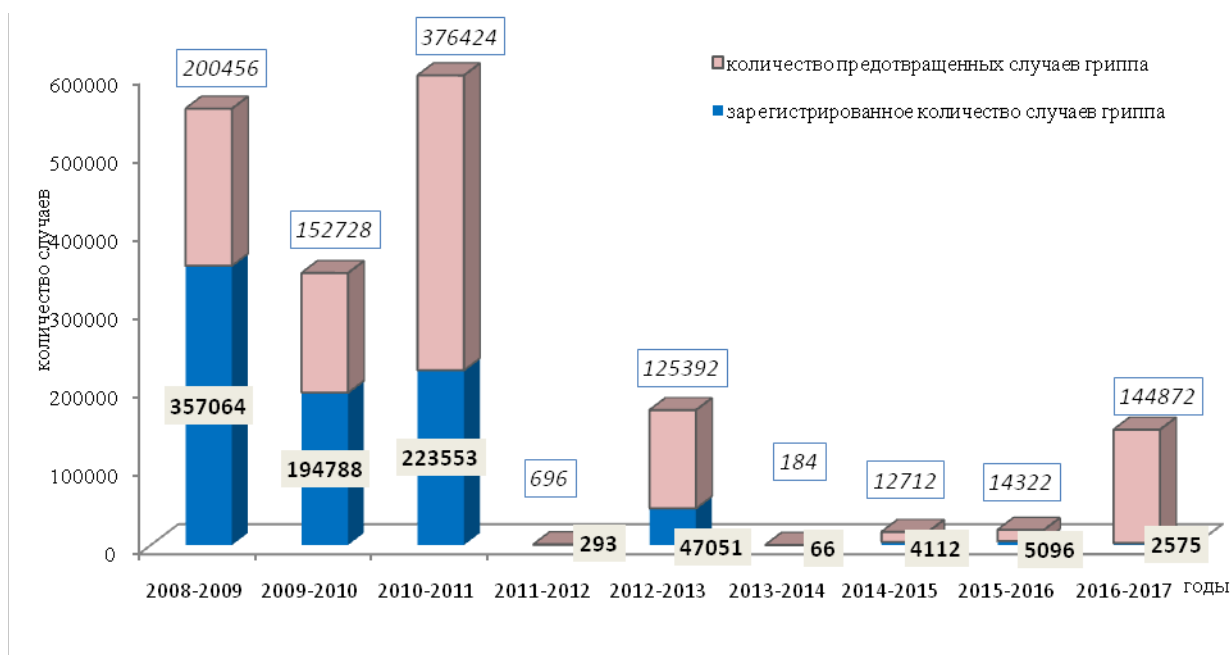


Рисунок 2. — Зарегистрированное и предотвращенное количество случаев гриппа среди населения Республики Беларусь за сезон заболеваемости 2008–2017 гг.

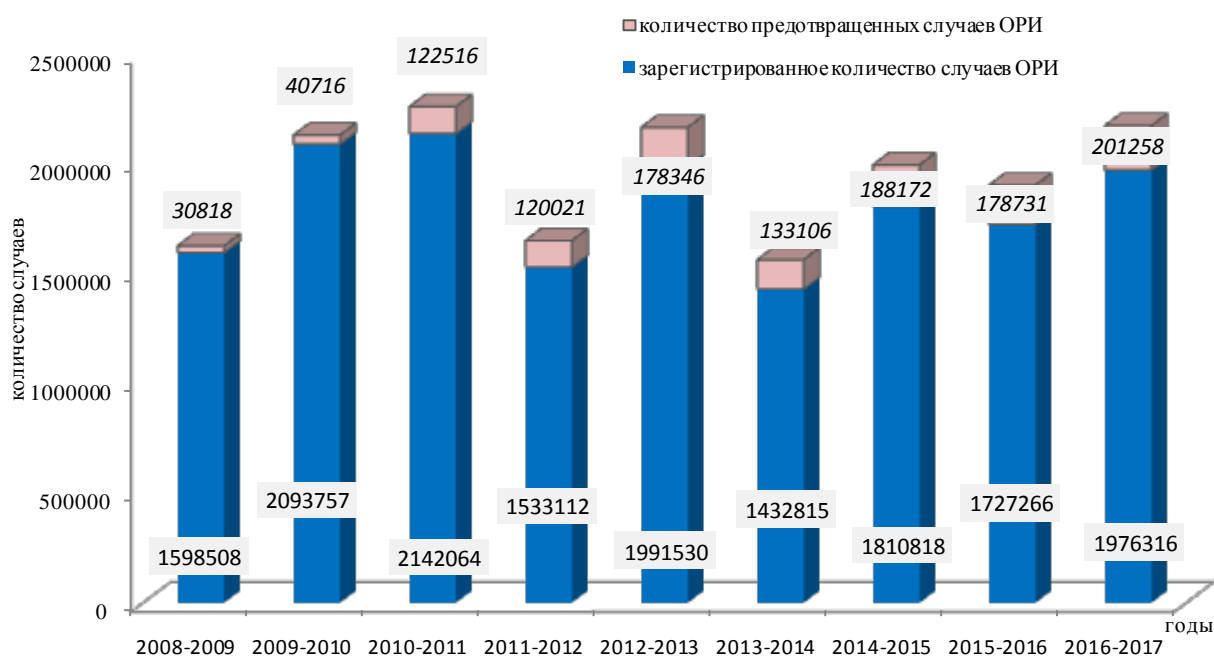


Рисунок 2а. — Зарегистрированное и предотвращенное количество случаев ОРВИ среди населения Республики Беларусь за сезон заболеваемости 2008–2017 гг.

Предотвращенный экономический ущерб благодаря проведенной вакцинации среди населения оценивается в сумму эквивалентную около 84,0 миллионов долларов. Следовательно, на каждый вложенный доллар в вакцинацию был получен эффект в эквиваленте 17,2 доллара.

Принимая во внимание уязвимость детского населения как контингента повышенного риска развития осложнений после перенесенного гриппа, высокое эпидемиологическое значение детей в распространении инфекции в семьях и среди

населения в целом, а также «прямые» и «непрямые» экономические потери, связанные заболеванием работающего населения, была проведена оценка эффективности противогриппозной вакцинации среди контингента детей и контингента работающего населения.

В 2016 г. охват вакцинацией детского населения страны составил 54,9 % (привито более 977 тысяч человек), что является максимальным показателем за последние три года (рисунок 3). Впервые за проведенные прививочные кампании охват вакцинацией против гриппа детей в возрасте от 6 месяцев до 3-х лет практически достиг оптимального, соответствующего рекомендациям ВОЗ, показателя 75 %.

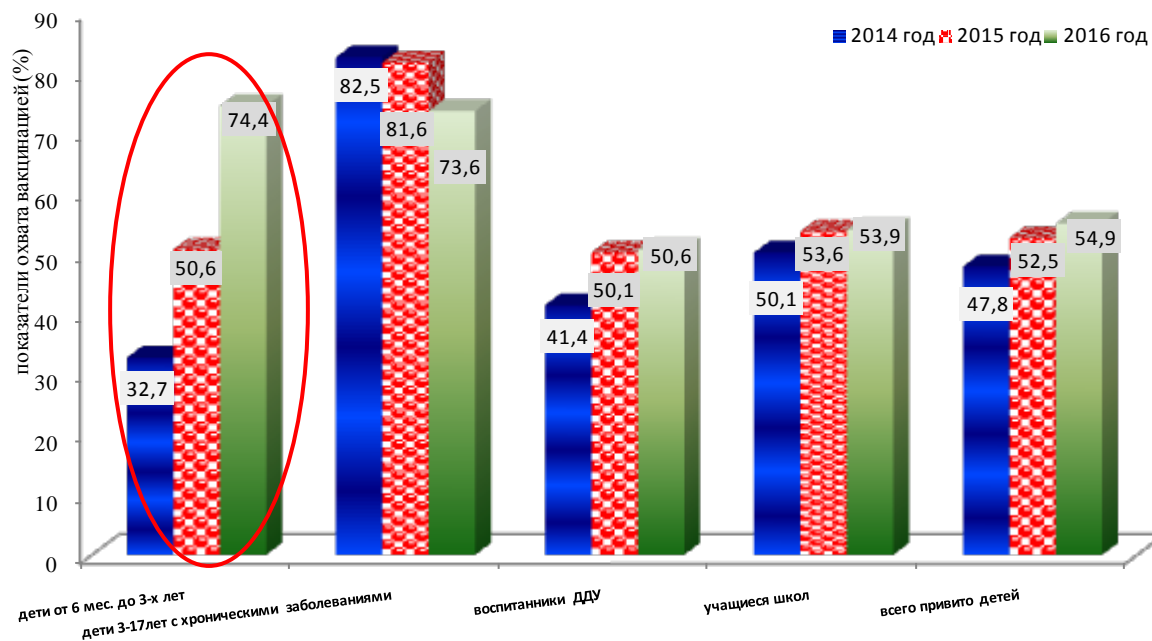


Рисунок 3. — Динамика охвата вакцинацией против гриппа отдельных групп детского населения Республики Беларусь за период 2014–2016 гг.

Результаты расчетов показали, что проведенная вакцинация позволила в сезон заболеваемости 2016–2017 гг. предупредить у детей более 27,5 тысяч случаев гриппа (в том числе более 4 тысяч случаев осложненных форм), более 94 тысяч случаев ОРИ негриппозной этиологии и обеспечить экономический эффект около 26,2 доллара на каждый вложенный доллар в вакцинацию детей.

Вакцинация в 2016 г. около 48,5 % работающего населения Республики Беларусь (более 1,87 миллиона человек) позволила предотвратить более 82 тысяч случаев гриппа (из них более 9,8 тысяч осложненных форм гриппа) и более 40 тысяч случаев ОРИ негриппозной этиологии и получить экономический эффект в 11,0 долларов на каждый вложенный доллар в вакцинацию.

Мониторинг уровня заболеваемости гриппом и ОРИ работающих на ряде предприятий республики показал, что проведение комплекса профилактических мероприятий, включающих противогриппозную вакцинацию с охватом более 40 % коллектива, позволяет снизить показатели заболеваемости среди привитых в 1,5–3,3 раза и привести практически к отсутствию случаев гриппа, а также к снижению в 4 и более раза заболеваемости ОРИ по сравнению с коллективами, где отмечены не высокие уровни охвата противогриппозной вакцинацией (рисунок 4). Оценка проводилась по предприятиям, количество работающих на которых и условия труда не имели существенных отличий.

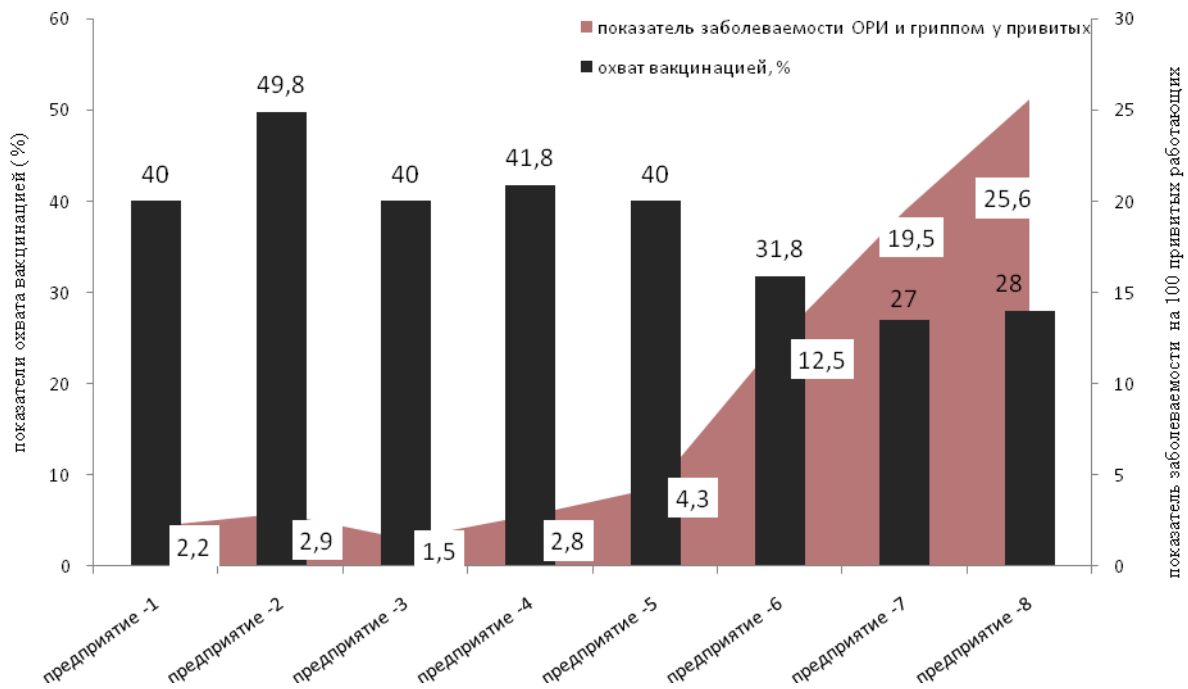


Рисунок 4. — Влияние вакцинации против гриппа на заболеваемость ОРИ и гриппом среди привитых против гриппа на отдельных предприятиях за сезон заболеваемости 2016–2017 гг.

При создании в трудовых коллективах иммунной прослойки 40 % и более заболеваемость ОРИ и гриппом среди не привитых работников таких предприятий в 1,6–2,5 раза ниже аналогичных показателей среди не привитого населения в целом (рисунок 5).

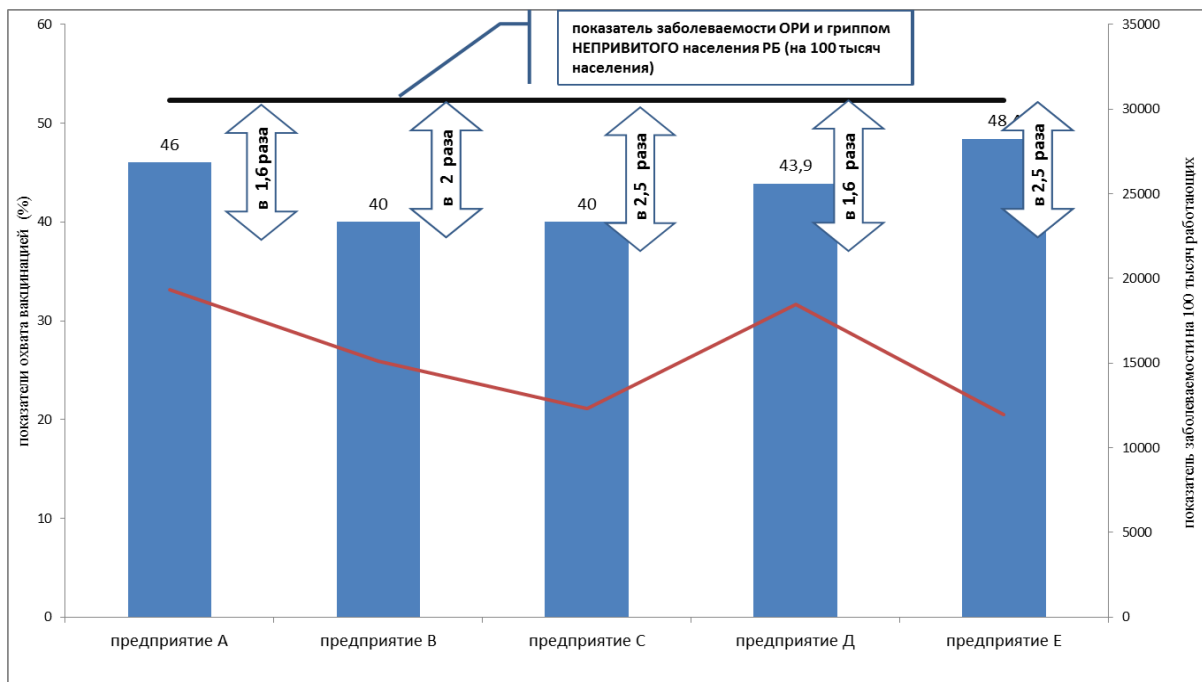


Рисунок 5. — Показатели заболеваемости ОРИ и гриппом среди не привитых работающих отдельных предприятий и не привитого населения Республики Беларусь за сезон заболеваемости 2016–2017 гг.

Выводы.

В течение 2008–2010 гг. — периода низких уровней охвата населения профилактическими прививками против гриппа (от 7,8 % до 10,7 %) показатели заболеваемости колебались от 3780,1 до 2031,1 на 100 тысяч населения. С 2011 г. охват профилактическими прививками населения страны планомерно увеличивался и достиг в последние годы 40 %. В течение этого периода заболеваемость гриппом населения находилась в диапазоне от 1,3 до 537,8 на 100 тысяч населения.

Отмечающаяся тенденция к снижению заболеваемости гриппом связана с состоянием коллективного иммунитета, широким проведением ряда профилактических мероприятий, в том числе противогриппозной вакцинации и относительно продолжительной циркуляцией близкородственных дрейфовых штаммов вирусов гриппа.

Благодаря проведенной вакцинации в сезон заболеваемости 2016–2017 гг. было предупреждено более 144,8 тысяч случаев гриппа, в том числе более 27,5 тысяч случаев среди детского населения, включая более 17 тысяч случаев осложненных форм (из них более 4 тысяч у детей), а также более 200 тысяч случаев ОРИ негриппозной этиологии, в том числе более 94 тысяч случаев у детей.

Предотвращенный экономический ущерб среди населения оценивается в сумму эквивалентную около 84,0 миллиона долларов, что по оценочным данным составляет 17,2 доллара на каждый вложенный в вакцинацию доллар. При этом следует отметить, что приведенные значения носят ориентировочный характер, рассчитаны как минимальные и отражают лишь определенную долю учтенных официальной статистикой случаев.

Вакцинация против гриппа работающих обеспечивает сохранение работоспособности и позволяет предупредить значительные расходы, связанные с временной утратой трудоспособности; охват вакцинацией 40 % работающих на предприятии является оптимальным с позиции соотношения затрат и полученной пользы и позволяет вносить вклад в снижение уровня заболеваемости гриппом и ОРИ.

Литература

1. WHO. Influenza vaccines. WHO position paper // *Weekly Epid. Rec.* — 2005. — Vol. 80. — P. 279–287.
2. Таточенко, В. К. Иммунопрофилактика-2009 : справочник / В. К. Таточенко, Н. А. Озерецковский, А. М. Федоров. — М. : Континент-Пресс, 2009. — С. 66–69.
3. Prevention and Control of Influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007 // *MMWR Rec. Rep.* — 2007. — Vol. 56, No. RR-6. — P. 1–54.
4. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children / A. Izurieta [et al.] // *N. Engl. Med. J.* — 2000. — Vol. 342. — P. 232–239.
5. Шаханина, И. Л. Грипп и острые респираторные заболевания — приоритетная социально-экономическая проблема здравоохранения / И. Л. Шаханина // *Эпидемиология и инфекционные болезни.* — 1998. — № 9. — С. 169–172.
6. Оценка экономического ущерба, наносимого вакциноуправляемыми болезнями: отчет о НИР (промежуточ.) / ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; рук. Михеева И. В. — М., 2016.
7. Бекзентеев, Р. Р. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики гриппа в России / Р. Р. Бекзентеев // *Вакцинация.* — 1998. — № 10. — С. 10.
8. Особенности эпидемиологического сезона по гриппу 2011–2012 гг. в Беларуси / Н. В. Грибкова [и др.] // *Здравоохранение.* — 2012. — № 11. — С. 28–32.
9. Targonski, P. V. Seasonal Influenza: Prevention With Influenza Vaccines. Medscape [Electronic resource] / P. V. Targonski, G. A. Poland. — 2017. — Mode of access : <http://www.medscape.org/viewarticle/545194>. — Date of access : 20.09.2017.

10. Иммунопрофилактика-2007 : справочник / В. К. Таточенко [и др.]. — М. : ИПК Контент-Пресс, 2007. — С. 70–71.
11. Методы эпидемиологической диагностики / под ред. Г. Н. Чистенко. — Минск : БГМУ, 2003. — 184 с.
12. Иммунопрофилактика инфекционных болезней. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики: метод. указания МУ 3.3.1878–04. — М., 2004.
13. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2011–2012 northern hemisphere influenza season // *Weekly Epid. Rec.* — 2011. — Vol. 86. — P. 81–92.
14. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013–2014 northern hemisphere influenza season // *Weekly Epid. Rec.* — 2013. — Vol. 88. — P. 101–116.
15. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016–2017 northern hemisphere influenza season // *Weekly Epid. Rec.* — 2016. — Vol. 91. — P. 121–132.

EPIDEMIOLOGICAL EFFECTIVENESS AND ECONOMIC VIABILITY OF INFLUENZA VACCINATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS POPULATION

*V.S. Vysotskaya¹, I.N. Glinskaya¹, I.A. Karaban², V.V. Pashkovich¹, V.V. Hryn¹,
N.P. Shmeleva³, N.V. Gribkova³*

¹*Republican Centre for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus;*

²*Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus;*

³*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus*

For the period of 2008–2010 with low influenza vaccination coverage levels (from 7.8 % to 10.7 %) incidence rates ranged from 3780.1 to 2031.1 (per 100 000 population). Since 2011, when the influenza vaccination coverage of the population has been increasing steadily and in recent years reached 40 %, the influenza morbidity level varied from 1.3 to 537.8 per 100 000 population. The downward trend in influenza morbidity in the Republic of Belarus is attributed to the level of collective immunity, the wide implementation of preventive measures, including influenza vaccination and the relatively long circulation of closely related drifted strains of influenza viruses.

Keywords: influenza, vaccination, vaccination effectiveness.

Поступила 05.09.2017

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ДИРОФИЛЯРИОЗУ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

А.И. Корзан¹, Л.Н. Ярец¹, С.В. Чирцова¹, Е.В. Ильяшева¹, Г.В. Садовникова¹,
Е.В. Подушкина¹, В.В. Карташев², Е. Carreton³, F. Simon⁴

¹ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», Брест, Беларусь;

²Ростовский государственный медицинский университет,
Ростов-на-Дону, Россия;

³University of Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain;

⁴University of Salamanca, Salamanca, Spain

Резюме. По результатам анализа 18 карт эпидемиологического обследования очагов дирофиляриоза за период с 2007 по 2016 гг. установлено, что в 88,9 % случаев имело место местное заражение населения. Показатель заболеваемости был в пределах 0,07—0,44 на 100 000 человек. Наибольшая доля клинических проявлений заболевания составляла весной — 38,8 % и 27,7 % осенью. Гельминт в 61,1 % случаев был локализован в области глаз, в 38,9 % — подкожно. Дирофиляриоз регистрировался преимущественно в Пинском Полесском регионе (68,7 %) — более теплой и влажной климатической зоне области с высокой численностью кровососущих комаров в популяциях, где действуют, как природные, так и синантропные очаги этой инвазии. К группе повышенного риска заражения отнесено население городов — 88,9 %. Возраст пациентов варьировал от 16 до 72 лет, чаще болели женщины — 61,1 %, служащие составили 50,0 %. Во всех случаях лабораторно были определены самки вида *Dirofilaria repens*, размер которых варьировал от 10 до 15 см.

Ключевые слова: дирофиляриоз, клиника, эпидемиология, профилактика.

Введение. *Dirofilaria repens* в настоящее время является одним из наиболее широко распространенных паразитов животных и человека на территории бывшего СССР и в Европе. Это связано с высокой частотой инвазии в популяции домашних и диких животных, изменениями климата и хозяйственной деятельностью [1–3]. Наиболее высокая заболеваемость человека зарегистрирована в Украине [1, 4], в частности, в тех областях, которые вплотную граничат с южными территориями Беларуси. Для здравоохранения Брестской области дирофиляриоз сравнительно новая проблема. Первый случай этой инвазии был зарегистрирован в Республике Беларусь в 1997 году, в Брестской области в 2007 [4–7].

Дирофиляриозы — трансмиссивные гельминтозы, вызываемые паразитированием неполовозрелых нематод *D. repens* и *D. immitis*. Первая вызывает инвазию, протекающую с поражением преимущественно кожи, слизистых, подкожной клетчатки, реже — внутренних органов и тканей, вторая — дирофиляриоз внутренних органов, в основном, легких. Основным дефинитивным хозяином дирофилярий являются собаки, кошки, лисы, промежуточными хозяевами и переносчиками — кровососущие комары родов *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* и другие (около 70 видов). Заражение человека происходит трансмиссивным путем через укусы кровососущих комаров, зараженных инвазионными личинками дирофилярий. В Беларуси из кровососущих комаров рода *Anopheles* и *Culex* были выделены два вида дирофилярий: *D. repens*; из комаров *Cx. pipiens* s. и *D. immitis* из *Cx. torentium* [8].

Целью данного исследования было изучение эпидемиологической ситуации по заболеваемости дирофиляриозом среди населения и географическое распространение очагов этой инвазии с учетом природно-климатических особенностей Брестской области.

Материалы и методы исследования. Для изучения распространения случаев заболеваний дирофиляриозом среди населения был проведен анализ карт эпидемиологического обследования очагов за период с 2007 по 2016 гг. из 7 территориальных центров гигиены и эпидемиологии.

Случаи дирофиляриоза были верифицированы как глазной и подкожный дирофиляриоз.

Макроскопические и микроскопические лабораторные исследования включали определение видовой принадлежности нематод (размер, наличие характерных удлинений на кутикуле, расположение вульвы и ануса, длины спикул у самцов). Исследования были проведены на базе паразитологической лаборатории ГУ «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

Полученные цифровые данные подвергнуты статистической обработке.

Результаты и обсуждение. В Брестской области за период с 2007 по 2016 гг. выявлено 18 случаев заболевания людей дирофиляриозом. У 16 человек заражение произошло на территории области ($88,88 \pm 7,62$ %), у 2-х ($11,11 \pm 7,62$ %) — за ее пределами (таблица) [6]. Причем, $77,78 \pm 10,08$ % всех случаев дирофиляриоза человека были выявлены за последние четыре года.

Таблица — Число больных дирофиляриозом за период с 2007 по 2016 гг.

Годы	Количество зараженных	Годы	Количество зараженных
2007	1	2012	1
2008	-	2013	6
2009	-	2014	2
2010	1	2015	3
2011	1	2016	3

Показатель заболеваемости находился в пределах 0,07—0,44 на 100000 человек.

Начало клинических проявлений дирофиляриоза на территории области происходило в течение всего года — с января по ноябрь месяцы с наибольшей долей случаев в весенние месяцы — $38,8 \pm 11,82$ % и осенью — $27,7 \pm 10,85$ %.

Обращение пострадавших лиц в организации здравоохранения области было в среднем на 45 день от даты заболевания, дата установления диагноза происходила в среднем на 6 день от даты обращения. При обращении диагностики у пациентов были следующие: «липома», «опухоль грудной клетки», «фиброма», «острый конъюнктивит», «инфекционный отек», «атерома», «глистная инвазия», «папиллома» и др. Гельминт был локализован в разных частях тела: в 11 случаях в области глаз ($61,1 \pm 11,82$ %); подкожно — в 7 случаях ($38,9 \pm 11,82$ %), в т.ч. в области лобной и теменной части головы, виска, шеи, ключицы, грудной клетки, плеча, живота, бедер и голени. В местах нахождения гельминта на теле человека отмечались: неприятные ощущения в глазу, чувство жжения, гиперемия, отек слизистой, зуд, болезненность, общая слабость, имели место периодические боли и чувство шевеления внутри «уплотнения» на теле. Зачастую пострадавших лиц отправляли к врачам-онкологам или психиатрам [6, 8].

Предполагаемыми местами заражения дирофиляриозом для населения области были территории: г. Бреста — 1, Барановичского района — 1, Ганцевичского — 1,

Дрогичинского — 1, Жабинковского — 1, Ивацевичского — 1, Лунинецкого — 1, Ляховичского — 1, г. Пинска — 4, Пинского района — 3, Столинского района — 1. При картографировании случаев заболеваний установлено, что $68,75 \pm 11,97$ % случаев заболеваний приходилось на территории речной системы Припяти (Столинский, Пинский, Лунинецкий, Ганцевичский и Дрогичинский районы), которые граничат с Гомельской областью Беларуси и Ровенской областью Украины, где также регистрируются случаи данной инвазии. Регион Пинского Полесья относится к более теплой и влажной климатической зоне Брестской области с высокой численностью кровососущих комаров в популяциях. На регион Брестского Полесья пришлось только 2 случая заболевания ($12,50 \pm 8,54$ %), иные территории — 3 случая ($18,75 \pm 10,69$ %) [6].

Проводимый многолетний энтомологический мониторинг за кровососущими комарами на территории области, в т.ч. в местах, где были выявлены случаи дирофиляриоза, подтверждает участие комаров рода *Culex* и *Aedes* в эпидпроцессе данного заболевания.

Условия для развития комаров наиболее благоприятны на территории области с мая по сентябрь месяцы, когда кровососущие комары распространены повсеместно, для этого имеется значительное количество временных и постоянных водоемов, которые способствуют выводу кровососущих комаров в течение всего теплого сезона.

Анализ сезонной динамики численности кровососущих комаров рода *Culex* и рода *Aedes* в открытой природе за последние 10 лет на территории области показал, что их численность в природе варьирует из года в год, однако сохраняется на стабильно высоком уровне. Так, самые высокие показатели численности комаров рода *Culex* за весь десятилетний период времени отмечены в 2011 г. с численностью 7,38 экземпляров при учете «на себе» и 16,30 экземпляров при учете на дневке (подвальное помещение). Также достаточно высокая численность имаго комаров рода *Culex* (до 150 экземпляров при учете «на себе») зарегистрирована в августе 2011 г. в открытой природе на территории Брестского и Жабинковского районов, поздняя их активность и относительно поздний уход на зимовку привели к увеличению средне-сезонных показателей численности. В 2013 г. погодные условия (большое количество осадков зимой и в весенние месяцы) способствовали образованию многочисленных временных водоемов в поймах рек и на заболоченных территориях, что и способствовало высокой численности ранневесенних видов комаров рода *Aedes*. Средне-сезонные показатели численности комаров рода *Aedes* в 2013 г. по области составили 10,62 экземпляров при учете «на себе» (самые высокие показатели численности за период с 2007 по 2016 гг.). В этом же году зарегистрированы и самые высокие показатели численности комаров данного рода в открытой природе в сезон их активности: с численностью 500 экземпляров в Брестском, 62 — в Барановичском, по 50 — в Лунинецком и Столинском, 30 — в Пинском районах при учете «на себе».

Предполагаемыми местами заражения населения, пострадавшего в результате укусов комаров, были преимущественно берега озер — 7 случаев ($38,9 \pm 11,82$ %) и берега рек — 2 случая ($11,1 \pm 7,62$ %) во время пребывания пострадавших лиц на рыбалке в вечернее время и утренние часы; территории городов — 4 случая ($22,2 \pm 10,08$ %); помещения многоквартирных домов, расположенных вблизи различных водоемов — в 3 случаях ($16,7 \pm 9,04$ %), территории частных домовладений с подтопленными подвалами — 2 случая ($11,1 \pm 7,62$ %). В большинстве случаев в частных домовладениях на подворье имелись домашние собаки. Пострадавшие лица предъявляли жалобы на обилие комаров в домах и квартирах, их многочисленные укусы. По месту заражения заболевших в $50,0 \pm 12,13$ % случаев установлены природные очаги инвазии и также в $50,0 \pm 12,13$ % случаев — синантропные очаги, что соответствует двум основным типам циркуляции возбудителя дирофиляриоза в природе: 1) комары, обитающие

на заболоченных территориях и питающиеся кровью представителей семейства псовых (волки, лисицы и другие), обитающих в диких природных условиях, заражают человека гельминтозом в природе при посещении этих участков территории; 2) синантропные, экологически связанные с человеком, комары *Culex pipiens/molestus* питающиеся кровью домашних животных (собак), заражают человека в населенных пунктах. В этом случае населенные пункты, при наличии популяции кровососущих комаров рода *Culex*, могут трансформироваться в синантропные очаги дирофиляриоза.

Становлению и дальнейшему функционированию синантропных очагов гельминтоза в районах Полесья наряду с благоприятными природными условиями, способствует и характер хозяйственной деятельности человека, поскольку в населенных пунктах создаются условия для выноса и обитания кровососущих комаров. Местами их размножения становятся прибрежные заболоченности рек, природные и искусственные водоемы, созданные человеком (ямы, канавы, карьеры, цистерны, бочки с дождевой водой), подтопленные подвалы жилых зданий, животноводческие помещения.

Среди пациентов доля жителей городов была в 8 раз больше, чем села и составила $88,9 \pm 7,62$ % (16 случаев), сельской местности — $11,1 \pm 7,62$ % (2 случая); гендерные группы населения были представлены 7 мужчинами ($38,9 \pm 11,82$ %) от 23 до 54-х лет и 11 женщинами ($61,1 \pm 11,82$ %) от 16 до 72-х лет. Возраст пациентов варьировал от 16 до 72 лет с превалированием в возрастной группе 30–34 года ($22,2 \pm 10,08$ %). Среди профессионально-бытовых групп населения чаще болели служащие ($50,0 \pm 12,13$ %) [6].

Во всех случаях окончательный диагноз «Дирофиляриоз» был установлен после хирургического удаления паразита и его лабораторного исследования — установления видовой принадлежности гельминта. Во всех случаях были установлены самки рода *D. repens*, в одном экземпляре, размер которых варьировал от 10 до 15 сантиметров [6].

Проводимый эпидемиологический и энтомологический мониторинг позволяет целенаправленно проводить совместно с ветеринарной службой комплекс профилактических, противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий, направленных на уменьшение риска заражения населения.

Профилактика заражения людей и животных должна основываться в первую очередь на прерывании трансмиссивной передачи дирофиляриозной инвазии и складываться из нескольких направлений: истребление комаров, выявление и дегельминтизация инвазированных домашних собак, предотвращение контакта комаров с домашними животными и человеком, информирование населения через средства массовой информации о мерах личной профилактики, правилах применения средств индивидуальной защиты.

Работа территориальных центров гигиены и эпидемиологии должна проводиться в направлении своевременного выявления мест массового размножения комаров, проведению по эпидемическим показаниям дезинсекционных мероприятий в синантропных очагах инвазии, усилению контроля над водоемами, продуцирующими личинок комаров рода *Culex* и своевременному проведению мероприятий по ограничению их численности (экологические меры борьбы, инсектицидные обработки).

В целях предотвращения массового выноса комаров необходимо также проведение работ по ликвидации ненужных в хозяйственном отношении и благоустройству, имеющихся водоемов, продуцирующих личинок комаров рода *Culex*, информированию руководителей территориальных ветеринарных служб о необходимости проведения профилактической дегельминтизации домашних животных (собак и кошек) в связи с активизацией кровососущих комаров в природе, выявлению и дегельминтизации инвазированных домашних собак.

Выводы

1. На территории области наметилась устойчивая тенденция к росту случаев заболеваний дирофиляриозом среди населения. Гельминт в 61,10±11,82 % случаев был локализован в области глаз, подкожно — в 38,9±11,82 % случаев. Инвазия регистрировалась на половине административных территорий области, преимущественно в Пинском Полесском регионе, относящемуся к речной системе реки Припять. К группе повышенного риска заражения следует отнести население городов, на долю которого приходится 88,90±7,62 % пострадавших лиц, преимущественно в возрасте 30–34 лет. Среди профессионально-бытовых групп населения чаще болели служащие (50,0±12,13 %).

2. Все случаи заболеваний были подтверждены лабораторно — определены самки рода *D. repens*, размер которых варьировал от 10 до 15 сантиметров.

3. В зоне влияния Пинского Полесья имеются предпосылки к формированию стойких природных и синантропных очагов дирофиляриоза, чему способствуют изменение климата (в сторону потепления); увеличение численности кровососущих комаров в популяциях; ландшафтно-географические особенности территории; гидрологическая характеристика мест выплода кровососущих комаров; степень связи с человеком; интенсивность борьбы с переносчиками дирофиляриоза; отсутствие профилактической дегельминтации домашних животных.

Литература

1. Regional warming and emerging vector-borne zoonotic dirofilariasis in the Russian Federation, Ukraine, and other post-Soviet states from 1981 to 2011 and projection by 2030 / V. Kartashev [et al.] // Biomed. Res. Int. — 2014. — 858936.

2. The complexity of zoonotic filariasis episytem and its consequences: A multidisciplinary view / F. Simón [et al.] // Biomed. Res. Int. — 2017. — 6436130.

3. Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain / J. A. Montoya-Alonso [et al.] // Parasit. Vectors. — 2017. — Vol. 10. No. 1. — P. 354–357.

4. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in Ukraine, an emergent zoonosis: epidemiological report of 1465 cases / R. V. Salamatin [et al.] // Acta Parasitologica. — 2013. — Vol. 135, No. 4. — P. 592–598.

5. Human subcutaneous/ocular dirofilariasis in the Russian Federation and Belarus, 1997—2013 / V. Kartashev [et al.] // Int. J. Infect. Dis. — 2015. — Vol. 33. — P. 209–211.

6. Случаи заболеваний дирофиляриозом среди жителей Брестской области Республики Беларусь / А. И. Корзан [и др.] // Актуальные проблемы инфектологии, эпидемиологии и медицинской паразитологии: современные технологии системы эпиднадзора, диагностики, лечения и профилактики : материалы междунар. науч.-практ. конф., Алматы, Казахстан, 16–17 апр., 2015 г. — Опубликовано в: Журн. инфектологии. — 2015. — Т. 7, № 2 (прилож.). — С. 58.

7. Дирофиляриоз (*D. repens*) в Российской Федерации и некоторых странах СНГ: ситуация и тенденция ее изменения / Т. И. Авдюхина [и др.] // Мед. паразитология. — 1997. — № 4. — С. 3–7.

8. Клиническая паразитология : руководство / А. Я. Лысенко [и др.]; под общ. ред. Н. Я. Лысенко. — Женева : ВОЗ, 2002. — 752 с.

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION ON HUMAN DYROPHILARIOSIS IN THE TERRITORY OF THE BREST REGION, THE REPUBLIC OF BELARUS

*A.I. Korzan¹, L.N. Yarets¹, S.V. Chirtsova¹, E.V. Ilyasheva¹, G.V. Sadovnikova¹,
E.V. Podushkina¹, V.V. Kartashev², E. Carreton⁴, F. Simon⁴*

¹*Brest Regional Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Brest, Belarus;*

²*Rostov State Medical University, Rostov-na-Donu, Russia;*

³*University of Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain;*

⁴*University of Salamanca, Salamanca, Spain*

Human and animal dirofilariasis is widely distributed in population of pets and humans in the territory of the Western Europe as well as in the territory of the former USSR. Based on the 18 protocols of the epidemiological investigation of the recognized cases of dirofilariasis from 2007 to 2016 we have found that in 88.9 % of cases were autochthonous. The incidence rate was in the range of 0.07–0.44 per 100,000 of population. The greatest proportion of clinical manifestations of the disease was in the spring — 38.8 % and 27.7 % in the fall. The helminth in 61.10 % of cases was localized in the eye area and in 38.9 % subcutaneously. Dirofilariasis was registered mainly in Pinsk Polesie region (68.7 %) — the most warmer and humid climatic zone of the region with a highest concentration of the blood-sucking mosquitoes where both natural and synanthropic foci of this invasion established. The inhabitants of cities (88.9 %) is considered to be at the highest risk of infection. The age of the patients varied from 16 to 72 years, women were more often affected than men — 61.1 %, employees accounted 50.0 % of the patients. In all cases immature female parasites of *D. repens* were recognized, the size of them varied from 10 to 15 centimeters.

Keywords: human dirofilariasis, clinical presentation, epidemiology, prevention, Belarus.

Поступила 26.09.2017

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДОНОРОВ С ВЫЯВЛЕННЫМИ HBsAg и aHCV

Е. Л. Красавцев, Д. В. Поварова

УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Резюме. При сравнении структуры доноров Гомельской областной станции переливания крови за 1993–2016 гг. с выявленными HBsAg и aHCV по полу отмечается возрастание количества женщин в 2011–2016 гг. и регистрируется возрастание количества лиц до 20 и уменьшение доли лиц 21–40 лет. Доля доноров с выявленными HBsAg старше 40 лет за прошедшие периоды статистически значимо не изменялась, но отмечается тенденция к возрастанию их количества. Выявленные изменения, вероятно, отражают изменения путей передачи в этот период времени. Также уменьшается доля доноров отстраненных по поводу выявления HBsAg при первой кроводаче или в течение первого года после регистрации и увеличивается доля доноров, у которых HBsAg был обнаружен после 5 лет кроводачи.

Ключевые слова: доноры, вирусные гепатиты, HBsAg, aHCV, структура по полу и возрасту.

Введение. В связи с введением вакцинации против гепатита В значительно снизилась заболеваемость острыми гепатитом В, но отмечается рост хронических форм как гепатита С, так и В [1].

С ростом заболеваемости вирусными гепатитами большое эпидемиологическое значение приобретает инфицированность доноров, обращающихся в центры крови для сдачи крови [2]. Доноры крови составляют 42,6 % среди состоящих на учете по поводу выявления HBsAg и 16,2 % — антител к вирусу гепатита С (aHCV) [3]. Не зная о факте своего инфицирования до постановки на учет, они представляют собой потенциально опасную группу по распространению вирусных гепатитов как парентеральным, так и половым путем.

Но многофункциональная медицинская помощь, характеризующаяся расширением круга специалистов, вовлеченных в процесс ее оказания, значительно повышает риск возникновения неблагоприятных последствий трансфузионной терапии. Высокий уровень распространения трансфузионных инфекций в общей популяции населения, обуславливает возможность обращения к донорству крови лиц, инфицированных этими инфекциями, находящимися в инкубационном периоде, либо не знающих своего статуса инфицированности [4].

В последние годы установлены значительные изменения в возрастной структуре заболевших вирусными гепатитами, обусловленными изменениями в структуре путей передачи гепатотропных вирусов [5, 6].

Цель исследования. Изучить изменение структуры доноров Гомельской областной станции переливания крови с выявленным HBsAg и aHCV по полу и возрасту.

Материалы и методы исследования. За 1993–2016 гг. на Гомельской областной станции переливания крови HBsAg был обнаружен у 706 доноров, aHCV — у 2235 доноров. В первом периоде (1993–2000 гг.) HBsAg выявлялся у 62, анти-HCV — у 320 человек. Во втором периоде (2001–2010 гг.) HBsAg обнаруживался у 405 человек, анти-HCV — у 1562. В третьем период (2011–2016 гг.) HBsAg был выявлен у 239 человек, aHCV — у 355. Для сравнения изменений в структуре по полу и возрасту в эти периоды использовались методы непараметрической статистики (таблица 2x2, критерий χ^2).

Результаты и обсуждение. В первом периоде (1993–2000 гг.) среди доноров Гомельской областной станции переливания крови с выявленным HBsAg было 80,65 % (50) мужчин и 19,35 % (12) женщин. Причем 66,1 % (41 человек) узнали, что имеют HBsAg при обследовании при первой кроводаче или в течение первого года после регистрации как донора. HBsAg был обнаружен после 5 лет кроводачи у 4,8 % лиц, отстраненных от донорства по этому поводу до 2000 г. Количество лиц до 20 лет в этом периоде было 6 (9,7 %), в возрасте 21–40 лет — 45 (72,6 %), старше 40 лет — 11 (17,7 %).

В этом же периоде среди доноров с выявленными aHCV было 70,3 % (225) мужчин и 29,7 % (95) женщин. Причем у 82 % (262 человек) анти-HCV обнаруживались при обследовании в течение первого года после регистрации как донора. Количество лиц до 20 лет в этом периоде было 16 (5 %), в возрасте 21–40 лет — 264 (82,5 %), старше 40 лет — 40 (12,5 %).

Во втором периоде (2001–2010 гг.) среди доноров Гомельской областной станции переливания крови с выявленным HBsAg мужчин было 67,65 % (274) и женщин — 22,35 % (131). У 75,3 % (305 доноров) впервые HBsAg был обнаружен при первой кроводаче или в течение первого года после регистрации как донора. HBsAg был обнаружен после 5 лет кроводачи у 8,4 % лиц, отстраненных от донорства по этому поводу в этом периоде. Количество лиц до 20 лет в этом периоде было 24 (5,9 %), в возрасте 21–40 лет — 286 (70,7 %), старше 40 лет — 95 (23,5 %).

В 2001–2010 гг. среди доноров с анти-НСV мужчин было 57,5 % (896) и женщин — 42,5 % (664). У 56,5 % (883 доноров) впервые анти-НСV были выявлены при обследовании в течение первого года после регистрации как донора. Количество лиц до 20 лет в этом периоде было 207 (13,3 %), в возрасте 21–40 лет — 1116 (71,5 %), старше 40 лет — 239 (15,3 %).

В 2011–2016 гг. среди доноров с выявленными HBsAg было 60,25 % (144) мужчин и 39,75 % (95) женщин. 48,5 % (116 человек) были отстранены по поводу выявления HBsAg при первой кроводаче или в течение первого года после регистрации. HBsAg был обнаружен после 5 лет кроводачи у 26,8 % лиц, отстраненных от донорства по этому поводу в этом периоде. Количество лиц до 20 лет в этом периоде было 18 (7,5 %), в возрасте 21–40 лет — 158 (66,1 %), старше 40 лет — 63 (26,4 %).

В этот же период среди доноров с выявленными аНСV было 61,1 % (217) мужчин и 38,9 % (138) женщин. У 71,3 % (253 человек) анти-НСV были обнаружены при обследовании в течение первого года после регистрации как донора. Количество лиц до 20 лет в этом периоде было 128 (36 %), в возрасте 21–40 лет — 188 (53 %), старше 40 лет — 39 (11 %).

При сравнении структуры доноров Гомельской областной станции переливания крови с выявленными HBsAg по полу отмечается возрастание количества женщин в 2011–2016 гг. до 39,75 % по сравнению с первым периодом (19,35 %, $p < 0,005$, $\chi^2 = 2,84$). Также регистрируется тенденция возрастания количества лиц старше 40 лет с 17,7 % в 1993–2000 гг. до 26,4 % в 2011–2016 гг. Уменьшается доля доноров отстраненных по поводу выявления HBsAg при первой кроводаче или в течение первого года после регистрации с 66,1 % до 2000 г. и 75,3 % в 2000–2010 гг. до 48,5 % после 2010 г. ($p < 0,02$, $\chi^2 = 2,33$ и $p < 0,01$, $\chi^2 = 6,81$, соответственно). Увеличивается доля доноров, у которых HBsAg был обнаружен после 5 лет кроводачи: с 4,8 % до 2000 г. и 8,4 % в 2000–2010 гг. до 26,8 % после 2010 г. ($p < 0,01$, $\chi^2 = 3,53$ и $p < 0,001$, $\chi^2 = 6,16$, соответственно), что свидетельствует о продолжении циркуляции вируса гепатита В и необходимости вакцинации от этого заболевания доноров.

При сравнении структуры лиц с выявленными аНСV среди доноров Гомельской областной станции переливания крови по полу отмечается возрастание количества женщин в 2011–2016 гг. до 38,9 % по сравнению с 1993–2000 гг. (29,7 %, $p < 0,02$, $\chi^2 = 2,43$), и 2001–2010 гг. (42,5 %) по сравнению с тем же периодом ($p < 0,001$, $\chi^2 = 4,24$). Также регистрируется возрастание количества лиц до 20 лет с 5 % в 1993–2000 гг. до 36 % в 2011–2016 гг. ($p < 0,001$, $\chi^2 = 9,74$) и уменьшение доли лиц 21–40 лет (в 1993–2000 гг. 82,5 % и в 2011–2016 гг. — 53 %, $p < 0,001$, $\chi^2 = 6,14$).

Также необходимо отметить, что различий по полу среди отстраненных по поводу обнаружения HBsAg и аНСV в изученные периоды не наблюдалось, кроме 2001–2010 гг. Так, в это время среди отстраненных по поводу выявления HBsAg мужчин было 67,65 %, а среди отстраненных по поводу выявления аНСV — 57,5 % ($p < 0,001$, $\chi^2 = 3,66$). Но выявлялись различия по возрасту. Так, 2001–2010 гг. и 2011–2016 гг. среди доноров с HBsAg по сравнению с донорами с аНСV меньше было лиц младше 20 лет (5,9 % и 13,3 % в 2001–2010 гг., $p < 0,001$, $\chi^2 = 4,002$ и 7,5 % и 36 % в 2011–2016 гг., $p < 0,001$, $\chi^2 = 7,82$). В то же время в указанные периоды было больше доноров старше 40 лет среди доноров с выявленными HBsAg по сравнению с донорами с аНСV (23,5 % и 15,3 % в 2001–2010 гг., $p < 0,001$, $\chi^2 = 3,88$ и 26,4 % и 11 % в 2011–2016 гг., $p < 0,001$, $\chi^2 = 5,89$). Выявленные отличия связаны с введенной во второй половине 90-х гг. вакцинации новорожденных и подростков от гепатита В и активностью парентерального пути передачи гепатита С среди молодых.

Выводы. При сравнении структуры доноров Гомельской областной станции переливания крови с выявленными HBsAg и аНСV по полу отмечается возрастание

количества женщин в 2011–2016 гг. и регистрируется возрастание количества лиц до 20 и уменьшение доли лиц 21–40 лет. Доля доноров с выявленным HBsAg старше 40 лет за прошедшие периоды статистически значимо не изменялась, но отмечается тенденция к возрастанию их количества. Выявленные изменения, вероятно, отражают изменения путей передачи в этот период времени. Также уменьшается доля доноров отстраненных по поводу выявления HBsAg при первой кроводаче или в течение первого года после регистрации и увеличивается доля доноров, у которых HBsAg был обнаружен после 5 лет кроводачи.

Также необходимо отметить, что 2001–2010 гг. среди отстраненных по поводу выявления HBsAg мужчин было больше, чем среди отстраненных по поводу выявления аHCV, в другие периоды различий по полу среди отстраненных по поводу обнаружения HBsAg и аHCV не наблюдалось, но выявлялись различия по возрасту: среди доноров с HBsAg меньше было лиц моложе 20 лет и больше 40 лет по сравнению с донорами с аHCV.

Литература

1. Хронический вирусный гепатит: прошлое, настоящее и будущее / В. В. Нечаев [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2013. — № 3. — С. 4–8.
2. Демин, Н. А. Вирусные гепатиты и донорство крови / Н. А. Демин // Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. — 2012. — Т. 7, № 2. — С. 522–523.
3. Изменение структуры пациентов с парентеральных вирусных гепатитов с хроническими вирусными поражениями печени и с выявленными маркерами парентеральных вирусных гепатитов состоящих на диспансерном учете / Е. Л. Красавцев [и др.] // Мед. новости. — 2016. — № 12. — С. 49–51.
4. Фазылов, В. Х. Этиологические и патогенетические аспекты диагностики и лечения вирусных гепатитов / В. Х. Фазылов // Казанский мед. журн. — 2013. — № 6. — С. 785–792.
5. Результаты изучения возможных путей заражения и распространенности вирусного гепатита С в одном из районов Санкт-Петербурга / Н. В. Златьева [и др.] // Рос. семейный врач. — 2006. — № 4. — С. 10–14.
6. Медицинская помощь больным с хроническими вирусными гепатитами в г. Москве — основные аспекты (по данным Консультативно-диагностического центра Инфекционной клинической больницы № 1) / Е. А. Нурмухаметова [и др.]. // Инфекционные болезни. — 2014. — № 4. — С. 88–98.

CHANGES IN THE STRUCTURE OF DONORS WITH HBsAg AND аHCV

Krasavtsev E.L., Povarova D.V.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

The comparison of donor structure at Gomel regional blood transfusion station during the period of 1993–2016 using the information on donors with identified HBsAg and аHCV on a gender basis marks the increase of amount of women during 2011–2016 as well as the increase of person aged below 20 and the decrease of percentage of person aged from 21 to 40. The share of donors with identified HBsAg and аHCV older than 40 during the past periods didn't change statistically significantly, though a tendency of increase is registered. The identified changes probably reflect changes in transmission paths during this time period. Also, the proportion of donors suspended on the basis of HBsAg detection in the first blood donation or within the first year after the registration decreases, and the proportion of donors with HBsAg detected after 5 years of blood donation increases.

Keywords: donors, viral hepatitis, HBsAg, аHCV, structure on gender and age.

Поступила 14.08.2017

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Т.П. Лапо, Н.В. Сивец, Н.П. Шмелёва, Н.В. Грибкова

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

Резюме. В последнее время коронавирусы человека все чаще идентифицируются как патогены, связанные с респираторными заболеваниями тяжелого течения. Только в начале XXI века в мире возникли сразу две вспышки заболеваний, связанные с представителями семейства *Coronaviridae*: в 2002 г. — тяжелый острый респираторный синдром (англ. severe acute respiratory syndrome, SARS), более известный благодаря СМИ как «атипичная пневмония», а также ближневосточный респираторный синдром (англ. Middle East respiratory syndrome, MERS) — в 2012. Оба заболевания отличались тяжестью течения и высоким процентом летальности. Менее известные представители семейства также вносят свой вклад в структуру заболеваний органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, который в настоящий момент все еще до конца не изучен [1–3]. В статье представлен обзор научной литературы, включающий аспекты молекулярной биологии, таксономии, а также эпидемиологии, клинических проявлений и диагностики коронавирусной инфекции человека.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, тяжелый острый респираторный синдром, ближневосточный респираторный синдром.

Введение. Острые респираторные инфекции (далее — ОРИ) вносят существенный вклад в структуру инфекционных заболеваний и по оценке Всемирной организации здравоохранения (далее — ВОЗ) являются причиной 4 млн. смертей ежегодно [4]. Вирусы гриппа А и В, парагриппа, адено-, рино-, метапневмо- и респираторно-синцитиальные вирусы являются наиболее искомыми этиологическими агентами в рутинных исследованиях медицинских лабораторий. Таким образом, вклад других патогенов, одним из которых является коронавирус человека (HCoV), остается не до конца изученным. Хотя первые представители семейства: HCoV-229E и HCoV-OC43, — были обнаружены еще в 60-х годах прошлого столетия, интерес к ним возник лишь в ноябре 2002 г., когда в Китайской провинции Гуандун возникла вспышка «атипичной пневмонии», впоследствии получившей название ТОРС-синдрома (тяжелого острого респираторного синдрома) [5–7].

Цель работы — анализ и обобщение современных данных об особенностях молекулярной биологии и таксономии, а также эпидемиологии, клинических проявлений и диагностики коронавирусной инфекции человека.

Согласно классификации международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) коронавирусы принадлежит отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, включающего в себя два подсемейства: *Coronavirinae* и *Torovirinae*. Подсемейства в свою очередь делятся на рода. Подсемейство *Coronavirinae* включает в себя 4 рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus*, *Torovirinae* — 2 (*Torovirus* и *Bafinivirus*) Род *Betacoronavirus*, в свою очередь, подразделяется на четыре подрода: А, В, С, D (таблица 1) [8].

Наиболее актуальными для человека являются представители трех родов: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* и *Torovirus* именно они могут вызывать развитие заболеваний верхних дыхательных путей (далее — ВДП) и желудочно-кишечного тракта (далее — ЖКТ). При этом в центре внимания находится род *Betacoronavirus*, в который входят возбудители «летальных пневмоний» — SARS-CoV и MERS-CoV (таблица 2) [8, 9].

Таблица 1. — Структура семейства *Coronaviridae*

Семейство	Подсемейство	Род	Естественный хозяин	Прототипный вирус
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirinae</i>	<i>Alpha-coronavirus</i>	Млекопитающие (в т. ч. человек)	Альфа-коронавирус 1 (AlphaCoV1 — alphacoronavirus 1)
		<i>Beta-coronavirus</i> ,	Млекопитающие (в т. ч. человек)	Коронавирус мышинных (MCoV — murine coronavirus)
		<i>Gamma-coronavirus</i>	Птицы, млекопитающие	Коронавирус птиц (ACoV — avian coronavirus)
		<i>Delta-coronavirus</i>	Птицы, млекопитающие	Коронавирус соловьев HKU11 (BuCoV HKU 11 — bulbul coronavirus HKU11)
	<i>Torovirinae</i>	<i>Torovirus</i>	Млекопитающие (в т. ч. человек)	Торовирус лошадей (EToV- equine torovirus)
		<i>Bafinivirus</i>	Рыбы	Вирус густер (WBV — white beam virus)

Таблица 2. — Таксономическое положение коронавирусов человека

Семейство	Подсемейство	Род	Вирус	Клинические проявления
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirinae</i>	<i>Alpha-coronavirus</i>	Коронавирус человека NL-63 (hCoV NL63)	Поражение ВДП и ЖКТ
			Коронавирус человека 229E (hCoV 229E)	
		<i>Beta-coronavirus</i>	Бетакоронавирус 1 (BetaCoV 1), ранее - HCoV OC43	Поражение ВДП
			Коронавирус человека HKU1	
	<i>Torovirinae</i>	<i>Torovirus</i>	ТОРС — ассоциированный коронавирус (SARS-CoV)	Пневмония
			БВРС-коронавирус (MERS-CoV)	
		<i>Torovirus</i>	Торовирус человека (hToV)	Поражение ВДП и ЖКТ

Структура вириона. Коронавирусы, как правило, имеют сферическую форму, диаметр вириона составляет от 60 до 120 нм [6]. Вирионы коронавирусов состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и гликопротеиновой оболочки, на поверхности которой находятся пепломеры длиной до 20 нм, образованные тримерами белка S. При электронной микроскопии данные пепломеры напоминают зубцы короны, за что семейство и получило свое название (рисунок 1) [10].

Таким образом, вирусная частица содержит четыре структурных белка. Это мембранный (M), оболочечный (E), нуклеокапсидный (N) белки, а также S-белок.

У большинства коронавирусов S-белок под действием фуриноподобных протеаз клетки-хозяина расщепляется на две субъединицы S1 и S2. Субъединица S1 отвечает за распознавание и взаимодействие с рецептором клетки хозяина, тогда как субъединица S2 обеспечивает слияние клеточных мембран [11]. Благодаря функции S-белка связываться с рецепторами клеток, определяется тканевой тропизм и видовая специфичность вируса. Так, согласно некоторым данным, вирус способен достигать центральной нервной системы и вызывать неврологические нарушения [9, 12].

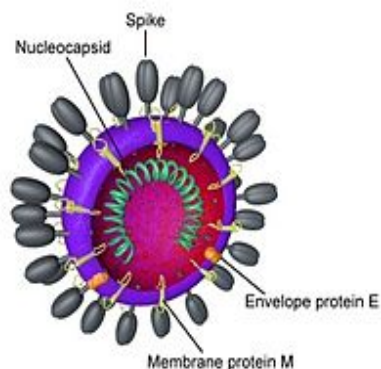


Рисунок 1. – Структура вириона коронавируса [10]

M-белок является наиболее распространенным структурным белком в вирионе и, как считается, придает вириону его форму [13].

E-белок встречается в вирионе в небольших количествах, обладает активностью ионного канала, облегчает сбор и высвобождение вируса и представляет собой важный фактор вирулентности [13].

Нуклеокапсидный белок N взаимодействует с геномной РНК, формируя нуклеокапсид вируса [10, 11].

У β -коронавирусов присутствует пятый структурный белок, гемагглютинин-эстераза (HE). Белок действует как гемагглютинин, связывает сиаловые кислоты на поверхности гликопротеинов и обладает ацетилэстеразной активностью. Считается, что он усиливает проникновение вируса через слизистую оболочку [13].

Геном коронавирусов представлен одноцепочечной положительно заряженной РНК, размером до 31 kb, что делает его самым крупным среди известных РНК содержащих вирусов [6].

Геномная РНК коронавирусов как и у всех представителей отряда *Nidovirales* экипирована на 5'- и полиаденилирована на 3'-конце. Структура альфа и бета коронавирусов представлена на рисунке 2 [5, 9].

Первые две трети генома со стороны 5'-конца кодируют полипептиды, необходимые для репликации вируса (1a, 1b). В то же время со стороны 3'-конца находятся последовательности, кодирующие следующие структурные белки: HE, S, E, M и N [5, 9].

Нетранслируемые 5'-UTR-последовательности длиной 200—600 н.о. и нетранслируемые 3'-UTR-последовательности длиной 200—500 н.о. содержат регуляторные элементы, способные влиять на биологические свойства (в том числе — вирулентность) вируса [9].

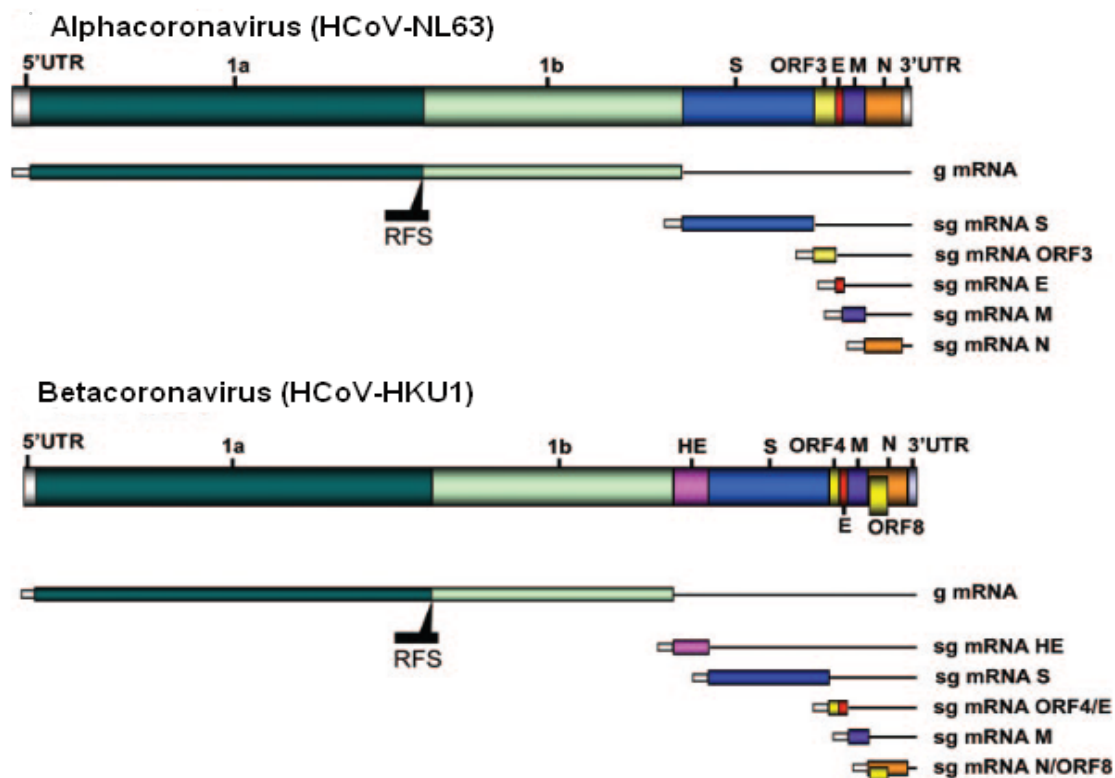


Рисунок 2. — Структура генома коронавирусов HCoV-NL 63 (род *Alphacoronavirus*) и HCoV-HKU1 (род *Betacoronavirus*) [5]

Основной особенностью репликации коронавирусов является образование субгеномных РНК. Коронавирусы проникают в клетку за счет рецепторного эндоцитоза или слияния мембран при участии поверхностных гликопротеинов S и HE для *Betacoronavirus*. Геном, попадая в цитоплазму и являясь мРНК, направляет синтез неструктурных белков и полноразмерного антигена. Далее на матрице антигена из одной точки инициации синтезируются полногеномная и набор субгеномных РНК разной длины. Синтез всех (+)нитей начинается на 3'-конце антигена «лидерной» последовательности длиной около 70 н.о. «Лидер» обладает слабой связью с матрицей и может отсоединяться от нее, а затем присоединяться к другому участку последовательности антигена. Такая легкость отсоединения вновь синтезированной цепи от матрицы обуславливает высокий уровень рекомбинации между РНК-геномами коронавирусов.

Созревание вирионов происходит путем почкования рибонуклеопротеида через мембраны шероховатого эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи и новые вирусные частицы покидают клетку в результате лизиса или слияния мембран [9, 14].

Клинические проявления. Коронавирусы, как правило, вызывают заболевания верхних дыхательных путей, но также могут приводить к осложнениям со стороны желудочно-кишечного тракта [6]. Основными клетками-мишенями являются эпителиальные клетки и макрофаги, имеющие на своей поверхности рецепторы, с которыми взаимодействует поверхностный S-белок вируса [9]. При гастроинтестинальной инфекции вирус поражает клетки слизистой оболочки кишечника, зачастую приводя к атрофии ворсинок [6].

У здоровых взрослых заболевания протекают, как правило, с умеренно выраженной интоксикацией и симптомами поражения верхних отделов респираторного тракта. У новорожденных, пожилых людей, лиц с иммунодефицитными состояниями, коронавирусная инфекция может протекать с поражением нижних дыхательных путей и развитием бронхитов и пневмоний, а в случае HCoV NL63 приводит к развитию крупа [15, 16]. Коронавирусы, обладая способностью к индукции апоптоза, вызывают некроз пораженных тканей, обуславливая образование у пациентов после выздоровления фиброзных рубцов в легких. Коронавирусы, индуцируя слияние клеток, оказывают сильное воздействие на проницаемость мембран клеток, что приводит к нарушению водно-солевого баланса и транспорта белков. В этих условиях может развиваться недостаточность сурфактанта (антиателектатический фактор), что приводит к коллапсу альвеол и легочному дистресс-синдрому.

Возможно коронавирусы принимают участие в развитии заболеваний центральной нервной системы, таких как рассеянный склероз [12]. Об этом могут свидетельствовать неврологические симптомы у некоторых пациентов, имеющих диагностический титр антител к вирусу HCoV OC43, а также результаты исследований по инфицированию нервных клеток человека вирусами HCoV 229E и OC43 [17–19]. Тем не менее, влияние коронавирусов в развитии неврологической патологии на данном этапе окончательно не изучено.

Иммунитет после перенесенного заболевания непродолжительный и не защищает от реинфекции.

Особенности эпидемиологии. Коронавирусная инфекция распространена повсеместно и регистрируется в течение всего года с пиками заболеваемости зимой и ранней весной, когда частота выявления коронавирусов может достигать 30 %. [20]. В Республике Беларусь, как показали проведенные нами исследования, в этиологической структуре возбудителей ОРВИ детского населения в 2010–2014, коронавирус являлся причиной заболевания в 3 % случаях, тогда как в период подъема заболеваемости ОРВИ частота его выявления достигала 8 % [21].

Кроме того, коронавирусная инфекция вносит значительный вклад в структуру ОРВИ у госпитализированных пациентов и составляет в среднем 12,4 % (с колебаниями в отдельные годы от 6,8 % до 28,6 %). Заболевания, обусловленные вирусами HCoV NL63 и HCoV 229E, часто дают осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта [6]. А поскольку коронавирусы могут передаваться не только воздушно-капельным, но и фекально-оральным и контактным путем, они, как правило, лидируют среди прочих вирусов в этиологии нозокомиальных инфекций.

Характерной особенностью генома коронавирусов является способность к рекомбинации и высокий уровень спонтанных мутации. Генетическая рекомбинация происходит с высокой частотой между геномами различных, но родственных между собой коронавирусов. Это может быть важным механизмом появления генетически измененных вирусов в природе. Примером этому является появление в середине ноября 2002 г. SARS-CoV, который впервые был выявлен в китайской провинции Гуандун, а затем в течение нескольких месяцев распространился на территории 30 государств Азии, Европы, Северной и Южной Америки, Африки и Австралии. Один завозной случай был также зарегистрирован и в Российской Федерации, в Благовещенске [1, 22]. Итогом этой масштабной эпидемии стало около 8,5 тыс. заболевших и более 800 умерших. Только благодаря интенсивным усилиям представителей медицинского сообщества удалось выявить и охарактеризовать возбудителя болезни и установить контроль над распространением эпидемии. Оказалось, что причиной возникновения и развития этого тяжелого заболевания явился

коронавирус, названный впоследствии коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV).

Проведенные исследования установили, что возбудитель SARS произошел от вируса, циркулирующего среди летучих мышей Chiroptera Microchiroptera, который преодолел видовой барьер и инфицировал куниц а затем приобрел тропизм к рецепторам респираторного тракта человека.

Второй случай преодоления видового барьера коронавирусом продемонстрировал в 2012 г., когда в Саудовской Аравии были зафиксированы случаи острого респираторного синдрома, сопровождающегося почечной недостаточностью. Новый коронавирус, официально получивший название коронавируса Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) (от англ. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV), приобрел способность инфицировать человека после адаптации в организме одногорбых верблюдов [23]. Природным резервуаром MERS-CoV также являются летучие мыши. Передача вируса человеку осуществляется в результате прямого или косвенного контакта с инфицированными промежуточными хозяевами — одногорбыми верблюдами (дромедарами). Также установлена возможность передачи вируса от человека к человеку при тесном контакте, в частности, в медицинских учреждениях [2].

Со времени регистрации первого случая в сентябре 2012 г. и по 21 июля 2017 г. число лабораторно подтвержденных случаев MERS достигло 2040, 82 % из которых приходится на Королевство Саудовской Аравии. О случаях БВРС также сообщили страны Ближнего Востока, Северной Африки, Европы, США и Азии (рисунок 3).

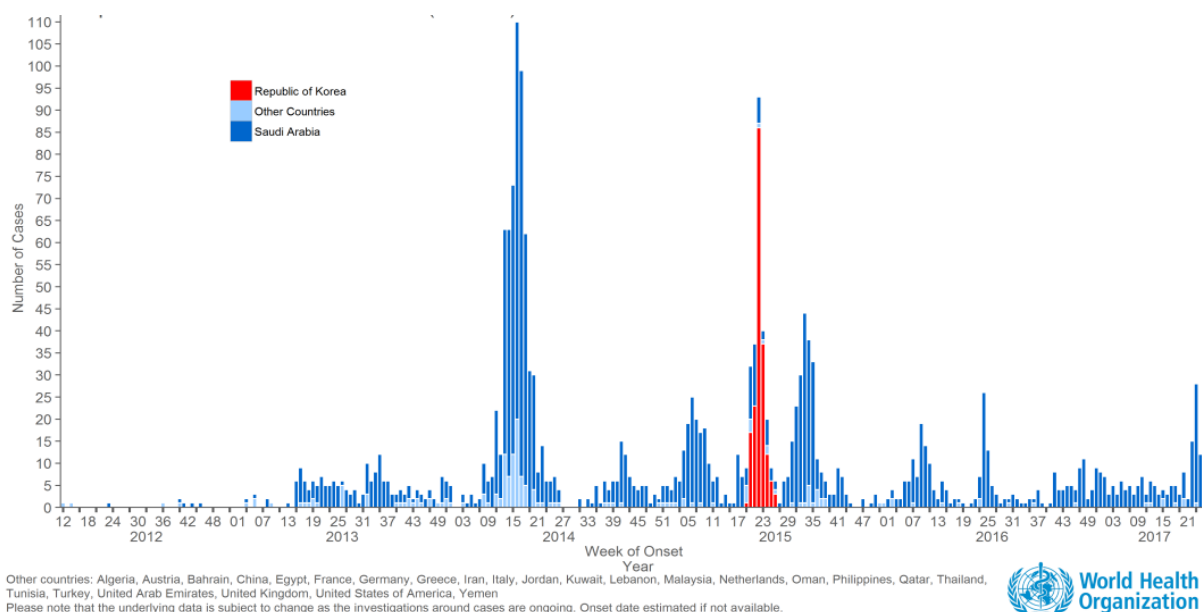


Рисунок 3. — Случаи заболевания БВРС по состоянию на 21 июля 2017 года [2]

Поскольку некоторые виды летучих мышей, которые являются природным резервуаром коронавирусов, могут быть инфицированы более чем одним коронавирусом, в их организме могут происходить генетические рекомбинации и последующее появление новых коронавирусов.

Диагностика. Самым специфичным и чувствительным методом лабораторной диагностики коронавирусной инфекции является вирусологическое исследование («золотой стандарт»). Однако выделение вируса весьма затруднено в связи с необходимостью наличия специальных клеточных культур, сложностью адаптации

возбудителя к культурам органов и тканей и может быть осуществлено только в специализированных лабораториях.

Для серологической диагностики может использоваться метод ИФА. четырехкратное и более нарастание титров антител при исследовании парных сывороток, (первая из которых берется в наиболее ранние сроки от начала заболевания, а вторая — через 2–3 недели), подтверждает этиологическую природу заболевания, но уже носит ретроспективный характер

Также для диагностики могут быть использованы экспрессные методы на основе иммунофлуоресценции или иммунохроматографии. Однако относительно низкая их чувствительность и возможность возникновения перекрестных реакций с другими видами коронавирусов являются существенными недостатками данных методов.

Наибольшее значение для лабораторной диагностики коронавирусной инфекции в настоящее время приобретает полимеразная цепная реакция (ПЦР), а именно ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Принципиальным преимуществом данного метода является получение результатов в достаточно короткие сроки, упрощение анализа, а также снижение количества манипуляций с исследуемым образцом, и, следовательно, снижение вероятности ошибок. Использование ПЦР позволяет осуществить быструю диагностику, что является полезным в плане выбора тактики ведения пациента [24].

Заключение. Коронавирусы вызывают широкий спектр клинических проявлений от легкой формы респираторного заболевания до тяжелой пневмонии. Также инфекция данного типа может способствовать нарушению деятельности желудочно-кишечного тракта и нервной системы. Как показала практика, сведения относительно семейства коронавирусов, имеющиеся к началу нового тысячелетия, оказались неполными. Хотя эпидемии ТОРС и БВРС значительно расширили представления научного мира о жизненном цикле коронавирусов и положили начало наблюдениям за его циркуляцией среди представителей животного мира, особенно среди летучих мышей и млекопитающих, имеющих непосредственный контакт с человеком, все же семейство изучено не до конца. Знания и опыт, полученные в результате новых исследований, в дальнейшем помогут избежать вспышек заболеваний, вызванных вновь появившимися патогенами, особенно возникающими в результате межвидовых передач.

Литература

1. WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 [Electronic resource]. — Mode of access : http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html. — Date of access : 20.08.2017.
2. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) WHO MERS-CoV Global Summary and Assessment of Risk July 2017 [Electronic resource]. — Mode of access : <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>. — Date of access : 20.08.2017.
3. The pediatric burden of human coronaviruses evaluated for twenty years / H. K. Talbot [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2009. — Vol. 28. — P. 682–687.
4. WHO. World health report 2004 statistical annex [Electronic resource]. — 2004. — Mode of access : <http://www.who.int/whr/2004/annex/en/>. — Date of access : 20.08.2017.
5. Pyrc, K. The novel human coronaviruses NL 63 and HKU1 / K. Perc, B. Berkhout, L. van der Hoek // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81, No. 7. — P. 3051–3057.
6. Siddell, S. The biology of coronaviruses / S. Siddell, H. Wege, V. Ter Meulen // *J. Gen. Virol.* — 1983. — Vol. 64, No. 5. — P. 761–776.
7. Co-circulation of four human coronaviruses (HCoV) in Queensland children with acute respiratory tract illnesses in 2004 / I. M. Mackay [et al.] // *Viruses.* — 2012. — Vol. 4. — P. 637–653.
8. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Electronic resource]. — Mode of access : <https://talk.ictvonline.org/>. — Date of access : 20.08.2017.

9. Щелканов, М. Ю. Коронавирусы человека (*Nidovirales, Coronaviridae*): возросший уровень эпидемической опасности / М. Ю. Щелканов, Л. В. Колобухина, Д. К. Львов. // Лечащий врач. — 2013. — № 10/13.
10. Wikipedia. The free encyclopedia [Electronic resource]. — Mode of access : <https://en.wikipedia.org/wiki/Coronaviridae/>. — Date of access : 20.08.2017.
11. Hu, B. Bat origin of human coronaviruses / B. Hu, X. Ge, L.-F. Wang // *Viol. J.* — 2015. — Vol. 12. — P. 221–226.
12. Geller, Ch. Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies / Ch. Geller, M. Varbanov, R. E. Duval // *Viruses.* — 2012. — Vol. 4. — P. 3044–3068.
13. Fehr, A. R. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis / A. R. Fehr, S. Perlman // *Meth. Mol. Biol.* — 2015. — Vol. 1282. — P. 1–23.
14. Новиков, Н. А. Молекулярные аспекты взаимодействия вирусов с клеткой: учебное пособие / Н. А. Новиков. — Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2015. — 87 с.
15. Croup is associated with the novel coronavirus NL63 / L. Van der Hoek [et al.] // *PLoS Med.* — 2005. — Vol. 2, No. 8. — P. 764–770.
16. Riski, H. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold / H. C. Riski, T. J. Hovi // *Med. Virol.* — 1980. — Vol. 6. — P. 259–265.
17. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43 / N. Arbour [et al.] // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73. — P. 3338–3350.
18. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E / N. Arbour [et al.] // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73. — P. 3326–3337.
19. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43 / N. Arbour [et al.] // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73, No. 4. — P. 3338–3350.
20. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with residuary tract infection / L. J. R. van Elden [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 7. — P. 652–657.
21. Сивец, Н. В. Эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции у госпитализированных детей в Республике Беларусь (2010–2014) / Н. В. Сивец, Н. В. Грибкова, Н. П. Шмелева // *Здравоохранение.* — 2014. — № 10. — С. 36–39.
22. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome / C. Drosten [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 348, No. 20. — P. 1967–1976.
23. Middle East respiratory syndrome coronavirus in Bats, Saudi Arabia / Z. A. Memish [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2013. — Vol. 19, No. 11. — P. 1819–1823.
24. Johani, S. MERS-CoV diagnosis: an update / S. Johani, A. H. Hajeer // *J. Infect. Public Health.* — 2016. — Vol. 9. — P. 216–219.

TOPICAL ISSUES OF HUMAN CORONAVIRUS INFECTION

T.P. Lapo, N.V. Sivets, N.P. Shmialiova, N.V. Gribkova

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

Until recently it was commonly accepted that the human coronaviruses are the pathogens mostly associated with the mild upper and lower respiratory tract infection. In the beginning of the new century, the outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) and Middle East respiratory syndrome (MERS), due to a newly discovered coronaviruses, led to a new awareness of the medical importance of the *Coronaviridae* family. These pathogens, responsible for an emerging disease in humans, with high risk of fatal outcome; underline the pressing need for new approaches to the management of the infection.

Keywords: coronaviruses, severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, SARS, MERS.

Поступила 19.09.2017

ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ

Л.П. Мамчиц, М.А. Чайковская

УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Резюме. Работа посвящена изучению заболеваемости Лайм-боррелиозом в Республике Беларусь. Детальная эпидемиологическая характеристика дана на примере Гомельской области. Целью исследования является акцентирование внимания врачей на вопросы своевременного выявления, диагностики боррелиозов и обоснование адекватных эпидемической ситуации противоэпидемических мероприятий. Среднемноголетний показатель заболеваемости Лайм-боррелиозом в Республике Беларусь составляет 10,6 на 100 тыс. населения. Группами риска заболеваний данной инфекцией являлось взрослое население, преимущественно городские жители, преобладали женщины. Основным клиническим симптомом была эритема в 55,6 % случаев, в 44,4 % случаев — слабость, повышение температуры, головная боль, боли в суставах.

Ключевые слова: заболеваемость, Лайм-боррелиоз, Республика Беларусь, эпидемиологическая характеристика, профилактика.

Введение. Болезнь Лайма (синонимы: клещевой Лайм-боррелиоз, иксодовый клещевой боррелиоз, хроническая мигрирующая эритема, клещевая эритема) — природно-очаговое, полисистемное заболевание, характеризующееся преимущественным поражением кожи, центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата [1]. Изучение заболевания как нозологической формы началось с 1975 г., когда А. Стиир описал воспалительную артропатию, связанную с нападением иксодовых клещей, у жителей города Лайм штата Коннектикут (США). По названию места, где проводились исследования, заболевание получило название болезнь Лайма. Основной переносчик возбудителя болезни (иксодовый клещ *Ixodes damini*) был установлен в 1977 г. В 1982 г. У. Бургдорфер выделил от пациента с болезнью Лайма и из клещей *Ixodes dammini* боррелий. Возбудитель болезни Лайма в 1984 г. отнесен к боррелиям и получил название *Borrelia burgdorferi* [2–6].

Открытие возбудителя болезни Лайма стало одним из самых важных событий конца XX века в медицинской микробиологии и инфекционной патологии. Оно положило начало описанию иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), которые по заболеваемости занимают одно из ведущих мест среди природно-очаговых инфекций [3–6].

Лайм-боррелиоз встречается на всех континентах, кроме Антарктиды. География распространения этого заболевания связана с широколиственными, смешанно-широколиственными и южно-таежными формациями растительности умеренного климатического пояса и совпадает с ареалом распространения клещевого энцефалита, что объясняется общностью природных резервуаров (теплокровные позвоночные) и переносчиков.

Несмотря на то, что болезнь Лайма поддается лечению антибиотиками, в Европейском регионе она является наиболее распространенным заболеванием, передаваемым переносчиками, которое может вызвать тяжелые осложнения со стороны нервной системы, сердца и суставов. Возбудителем заболевания является спирохета, которая передается человеку через клещей, а животными-носителями возбудителей инфекции в природе являются мелкие грызуны, насекомоядные, зайцы и птицы.

Клещи высокочувствительны к сезонным изменениям климата. Начиная с 1980-х гг. плотность популяции клещей возросла, а ареал их распространения в Европе достиг более высоких широт и высокогорных местностей. Таким образом, климатические изменения в Европе в будущем могут способствовать распространению болезни Лайма,

при этом частота случаев этого заболевания в районах, где климат становится более жарким и сухим, будет сокращаться [9, 10].

Заболеваемость Лайм-боррелиозом (ЛБ) составляет в среднем 10,6 случаев на 100 тыс. населения в Республике Беларусь (для сравнения: распространенность заболеваемости другой клещевой инфекцией — клещевым энцефалитом — отмечалась лишь на уровне 1,13 случая на 100 тыс. населения). При этом за последние два десятилетия с момента начала официальной регистрации Лайм-боррелиоза в нашей стране заболеваемость данной инфекцией выросла более чем в 15 раз. Большая распространенность болезни Лайма отмечается в Латвии — 22,4, в Литве — 86,8, в Польше — 22,8 на 100 тыс. населения. Число случаев заболевания, зарегистрированных на Украине в 2012 г., составило 3,6, а в Российской Федерации в 2011 г. — 7,0 на 100 тыс. населения [9].

Единственно возможными переносчиками болезни Лайма являются иксодовые клещи, для Республики Беларусь — *Ixodes ricinus* (лесной клещ). Иксодовый клещ в своем развитии проходит ряд стадий (яйцо-личинка — нимфа — взрослая особь), каждая стадия занимает в среднем 1 год. Инфекционными (т.е. содержащими возбудитель ЛБ) для человека являются нимфы и взрослые особи. Нимфы характеризуются малыми размерами по сравнению с взрослой особью клеща, что может объяснять частое отрицание пациентами с развившейся клещевой инфекцией присасываний клещей в ближайшем анамнезе [9, С. 65].

В 2015 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 1169 случаев болезни Лайма, в 2016 — 1864 случая. Очаги болезни регистрируются во всех регионах Беларуси, но наибольшая активность отмечается в районах Брестской, Минской и Гомельской областей [7–10].

Целью нашего исследования явилось изучение заболеваемости ЛБ в Республике Беларусь (детальная эпидемиологическая характеристика на примере Гомельской области), акцентирование внимания врачей на вопросы своевременного выявления, диагностики боррелиозов и обоснование адекватных эпидемической ситуации профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Материал и методы исследования. Использованы данные официального учета заболеваемости ЛБ населения; изучены карты эпидемиологического обследования очагов ЛБ (75 карт), данные лабораторных исследований вирусологической лаборатории Гомельского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, данные информационно-аналитического бюллетеня Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. Применены методы эпидемиологической диагностики — ретроспективный эпидемиологический анализ, описательно-оценочные методы. Распространенность ЛБ по отдельным территориям и в отдельных группах населения оценивалась по показателям заболеваемости, рассчитанным на 100 тыс. населения.

В ходе анализа годовой динамики заболеваемости ЛБ определяли сроки начала и окончания сезонного подъема, его продолжительность, месяц максимальной и минимальной заболеваемости, а также структуру годового показателя заболеваемости, то есть, удельный вес заболеваемости, обусловленной действием круглогодичных, сезонных факторов и вспышечной заболеваемости.

Статистические методы применяли для оценки интенсивных и экстенсивных показателей, средних величин, установления достоверности результатов исследования и их отклонений.

Результаты исследования. На территории Беларуси эпидемическая ситуация по ЛБ изучается с 1994 г. Первый случай данного заболевания в стране был выявлен

у жительницы Минска на основании клинико-эпидемиологических данных и серологической верификации диагноза.

Ареал распространения ЛБ совпадает с клещевым энцефалитом, но заболеваемость ЛБ значительно выше. Среднеголетний показатель заболеваемости ЛБ в Республике Беларусь за последние 10 лет составлял 10,6 на 100 тыс. населения. Наиболее высокие уровни заболеваемости ЛБ, выше среднеголетнего уровня, зарегистрированы в г. Минске, Гродненской и Брестской областях (рисунок 1).



Рисунок 1. — Среднеголетняя заболеваемость Лайм-боррелиозом по областям Республики Беларусь

На основании результатов исследования зараженности боррелиями иксодовых клещей и серологического обследования населения циркуляция возбудителей выявлена на большинстве обследованных к настоящему времени административных районов. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что практически вся территория страны является эндемичной в отношении ЛБ и определяет необходимость организации системы эпидемиологического надзора за данной инфекцией на районном и областном уровнях [7].

В Гомельской области изучение эпидемиологической ситуации по ЛБ начато с 1996 г., хотя, учитывая тот факт, что переносчик боррелий и вируса клещевого энцефалита один и тот же, энтомологический надзор за клещами проводится давно.

Среднеголетний показатель заболеваемости населения Гомельской области за последние 10 лет 7,0 на 100 тыс. населения. Многолетняя эпидемическая тенденция заболеваемости ЛБ в Гомельской области характеризуется прямолинейной выраженной тенденцией к росту, темп прироста составляет 16,4 % (рисунок 2).

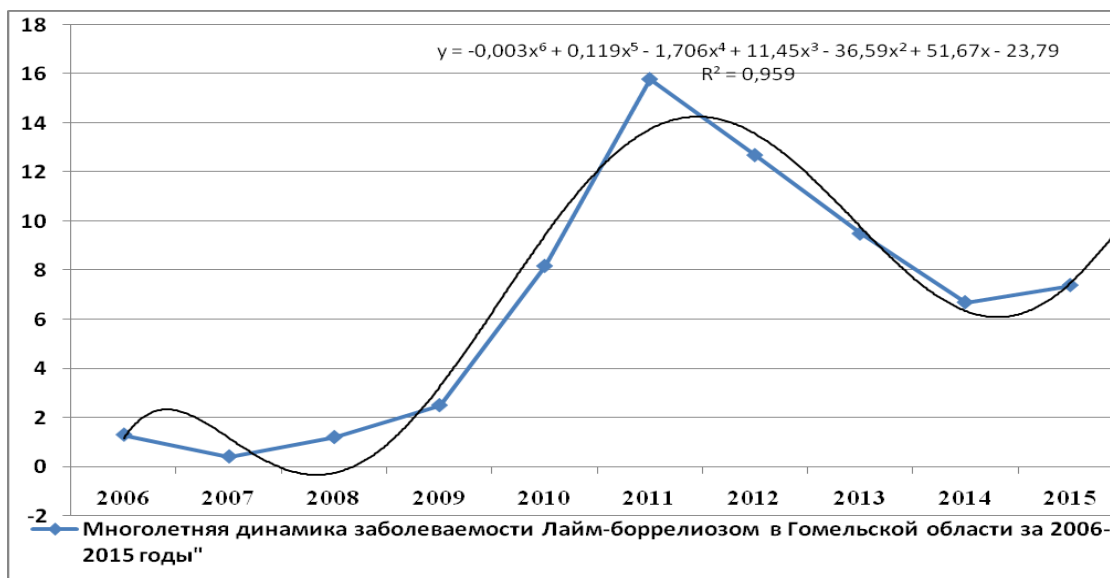


Рисунок 2. – Многолетняя динамика заболеваемости Лайм-боррелиозом в Гомельской области за 2006–2015 гг.

Максимальный уровень заболеваемости ЛБ зарегистрирован в 2011 г. (15,8 на 100 тыс. населения). Рост заболеваемости ЛБ можно объяснить улучшением диагностики и повышением настороженности клиницистов к этой инфекции.

Многолетняя динамика заболеваемости ЛБ характеризовалась выраженной периодичностью. За исследуемый период наблюдался один полный цикл, включавший завершённый подъем и спад заболеваемости ЛБ продолжительностью 8 лет. Подъем заболеваемости продолжался 4 года с 2010 по 2013 гг., продолжительность спада также составляла 4 года с 2006 по 2009 гг. Амплитуда периодов подъема и спада характеризовалась одинаковой выраженностью и продолжительностью (рисунок 3).

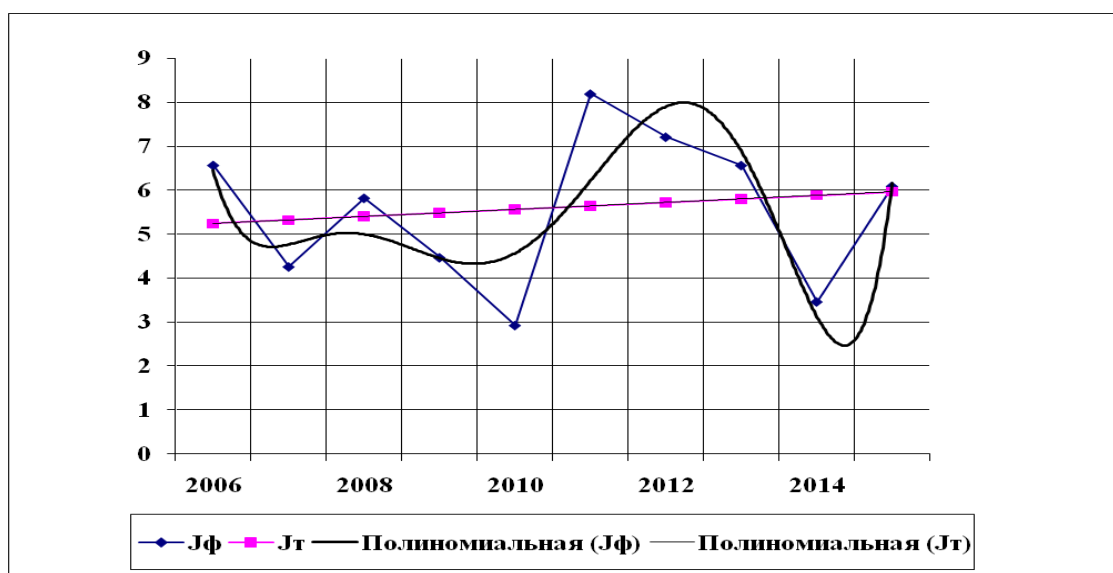


Рисунок 3. – Многолетняя периодичность заболеваемости Лайм-боррелиозом в Гомельской области за 2006–2015 гг.

В 2014–2015 гг. заболеваемость ЛБ находилась в периоде спада, а с 2016 г. в периоде подъема.

Годовая динамика заболеваемости (по среднесезонным данным) распределялась неравномерно. Сезонный подъем отмечался в летне-осенний период, с июня по ноябрь, продолжительностью 6 месяцев. Максимум заболеваний приходился на август (18 % регистрируемых за год случаев); минимальный уровень заболеваемости регистрировался в мае. Наибольшее влияние на формирование заболеваемости ЛБ оказывают сезонные факторы — 82,4 %; удельный вес круглогодичных факторов составил 17,6 %. Преобладание сезонных факторов обусловлено, прежде всего, периодом активности клещей.

Заболеваемость ЛБ в Гомельской области характеризовалась неравномерностью территориального распределения. Циркуляция возбудителя выявлена во всех районах Гомельской области. Полученные данные свидетельствуют о наличии на территории Гомельской области активного природного очага ЛБ. Более высокий уровень заболеваемости отмечался в Рогачевском, Светлогорском, Жлобинском районах по сравнению с остальными районами. Есть все основания полагать, что подавляющая часть заболеваний ЛБ как среди городского, так и особенно среди сельского населения не выявляется, проходя под другими диагнозами.

Чаще в эпидемический процесс вовлекалось взрослое население области (91,6 %). Удельный вес городского населения в общей структуре заболевших составляет 83,4 %. Это может свидетельствовать, с одной стороны, о не выявлении ЛБ среди сельского населения, с другой стороны — о более частом посещении городского населения лесных массивов, распространении клещей в городах по парковым коридорам, расширении сети садоводческих и дачных кооперативов [1].

При эпидемиологическом обследовании очагов выяснено, что у всех заболевших заражение произошло через укус клеща при посещении леса в период с мая по сентябрь. Среди заболевших преобладали женщины (69,4 %). Это связано с более частым посещением женщинами леса для сбора ягод и грибов, участием в работе на даче, поле и др. Случаи заболевания ЛБ связаны с пребыванием в лесных массивах — 52,8 %, на дачных участках — 36,1 % или в лесопарковых зонах в черте города — 11,1 %. Это свидетельствует о широкой зоне распространения ЛБ и подтверждается результатами мониторинга за численностью клещей в природе.

В структуре заболевших по социальному статусу наиболее часто болели лица трудоспособного возраста от 23 до 59 лет (52,8 %), пенсионеры составили среди заболевших 25 %, дети — 22,2 %

Основным клиническим симптомом была эритема в 55,6 % случаев, в 44,4 % случаев — слабость, повышение температуры, головная боль, боли в суставах. Пациенты с ЛБ могут проходить под диагнозом аллергической реакции на укус клеща, вторая и третья стадия заболевания могут не диагностироваться как ЛБ, что говорит о гиподиагностике данной инфекции.

Важной характеристикой эпидемической ситуации по ЛБ являются данные энтомологического мониторинга. Для *Ix. ricinus* в Республике Беларусь характерны два пика активности — ранняя весна и середина лета и осень, и в эти периоды наблюдается пик заболеваемости ранними стадиями ЛБ. В то же время в 2014 г. по данным систем массовой информации, первые присасывания клещей на нашей территории были отмечены в феврале, а в 2015 г. — даже в январе, поэтому клиницисты могут встречаться с проявлениями ранних стадий ЛБ даже зимой [9, С. 66].

Иксодовые клещи на территории области представлены двумя видами: *D. reticulatus*, *Ix. ricinus*. В результате анализа заболеваемости по факторам риска

установлена полная прямая корреляционная связь между уровнем заболеваемости ЛБ и показателями бактериофорности клещей (коэффициент корреляции $r=0,9$). [7, С. 128].

Заключение. Наиболее значимыми направлениями профилактики, на наш взгляд, являются:

1. Активное выявление устойчивых эндемических природных очагов ЛБ на территории области и применение эффективных акарицидных обработок в активных природных очагах данной группы инфекций.

2. Совершенствование уровня подготовки врачей по вопросам профилактики, диагностики, лечения и реабилитации при ЛБ, особое внимание уделять безэритемным и хроническим формам.

3. Для врача, подозревающего у пациента наличие ЛБ, важны в большой степени данные эпидемиологического анамнеза: работа на приусадебных участках, посещение леса и лесопарков, пребывание на природе в регионах с высокой распространенностью ЛБ, профессиональная деятельность на открытом воздухе и другие факторы, потенциально способствующие инфицированию.

4. При проведении информационно-образовательной работы среди населения акцентировать внимание на вопросы профилактики присасывания клещей: использование отпугивающих средств, рациональная одежда, регулярные само- и взаимоосмотры при посещении леса, дачных участков и др.

Литература

1. *Алексеев, А.Н., Рудаков, Н.В., Дубинина, Е.В.* Возможные варианты заболеваний клещевыми инфекциями и прогностическая роль анамнеза в их диагностике (паразитологические аспекты проблемы) // А.Н. Алексеев, Н.В. Рудаков, Е.В. Дубинина / Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2004.—№4— С. 31–35.

2. *Ананьева, Л.П.* Иксодовый клещевой боррелиоз. Экология, клиническая картина и этиология // Л.П. Ананьева / Терапевтический архив. — 2000.—№5— С. 72–78.

3. *Барскова, В.Г., Ананьева, Л.П., Фёдорова, Е.С.* Возраст и течение Лайм-боррелиоза // В.Г. Барскова, Л.П. Ананьева, Е.С. Фёдорова / Терапевтический архив.— 2000.—№11— С. 30–31.

4. *Близнюк, А.М., Чистенко, Г.Н., Гузовская, Т.С.* Болезнь Лайма: этиология, эпидемиологическая характеристика и основы профилактики // А.М. Близнюк, Г.Н.Чистенко, Т.С. Гузовская / Мир медицины. — 2005.—№4— С. 10–14.

5. *Бондаренко, А.Л., Тарловская, Е.И., Тихомолова, Е.Г., Жолобова, Т.В.* Боррелиозная инфекция как возможная причина развития дилатационной кардиомиопатии в эндемичном регионе // А.Л. Бондаренко и др. / Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2007.—№4— С. 37–38.

6. *Вельгин, С.О.* Клинико-эпидемиологический анализ болезни Лайма в Беларуси // С.О. Вельгин / Здравоохранение. — 2000.—№4— С. 22–25.

7. *Мамчиц, Л.П., Нараленкова, Е.Ю., Чайковская, М.А.* Эпидемиологические закономерности распространения Лайм-боррелиоза в Гомельской области // Л.П. Мамчиц / Проблемы здоровья и экологии. — 2009. — №2(20). — С.123–128.

8. *Щерба, В.В., Комар, В.И., Юркевич, И.В.* Лайм-боррелиоз // В.В. Щерба, В.В. Комар, И.В. Юркевич / Медицинские знания. — 2005.—№3— С. 36–37.

9. *Карпов, И.А., Соловей Н.В., Анисько Л.А., Щерба В.В., Данилов Д.Е.* Лайм-боррелиоз: вопросы диагностики и рациональной этиотропной терапии / И.А. Карпов, Н.В. Соловей и др. //Клиническая инфектология и паразитология. — № 3 (14) — 2015. — С.64–78.

10. *Elisabet Lindgren Thomas, G.T. Jaenson* Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures 2006, 34 p. Электронный ресурс: www.euro.who.int/ru/publications/abstracts/lyme-borreliosis-in-europe/-influences-jf-climate-and-climate-change/-epidemiology,-ecology-and-adaptation-measures — дата доступа: 19.06.2017].

LYME-BORRELIOSIS IN BELARUS: ACTUAL ISSUES OF EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSTICS AND PREVENTION

L.P. Mamchits, M.A. Chaikovskaya
Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

The work is devoted to the study of the incidence of Lyme-borreliosis in the Republic of Belarus. A detailed epidemiological description is given on the example of the Gomel region. The aim of the study is to focus physicians' attention to the timely detection, diagnosis of borreliosis and the rationale for an adequate epidemic situation of antiepidemic measures. The average annual incidence rate of Lyme borreliosis in the Republic of Belarus is 10.6 per 100,000 population. Groups of risk of this infection was the adult population, mainly urban residents, women predominated. The main clinical symptom was erythema in 55.6 % of cases; weakness, fever, headache, joint pain were in 44.4 % of cases.

Keywords: morbidity, Lyme-borreliosis, incidence, Republic of Belarus, epidemiological characteristics, prevention.

Поступила 30.06.2017

ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

А.В. Русанович¹, С.В. Сергеенко¹, И.А. Карабан², И.Н. Глинская¹

¹ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
Минск, Беларусь;

²Министерство здравоохранения Республики Беларусь,
Минск, Беларусь

Резюме. В Республике Беларусь наблюдается тенденция к росту заболеваемости ВИЧ-инфекцией, темп прироста новых случаев за последние 5 лет составил 95,3 %. Наиболее значимыми группами в развитии эпидемического процесса по ВИЧ-инфекции являются потребители инъекционных наркотиков, женщины секс-бизнеса и мужчины, имеющие сексуальные отношения с другими мужчинами.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, заболеваемость, дозорный эпидемиологический надзор, профилактика, передача ВИЧ от матери ребенку.

Целью настоящего исследования явился анализ эпидемической ситуации по ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь.

Введение. По критериям, принятым Всемирной организацией здравоохранения (далее — ВОЗ), распространенность ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь соответствует концентрированной стадии и удерживается преимущественно в пределах отдельных, наиболее уязвимых к ВИЧ групп населения: среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН); женщин секс-бизнеса (ЖСБ); мужчин, имеющих сексуальные отношения с другими мужчинами (МСМ). По данным дозорного эпидемиологического надзора (ДЭН), проведенного в 2015 г., уровень пораженности среди ПИН составил 25,1 %, ЖСБ — 6,8 % и МСМ — 5,7 % [1].

Материалы и методы исследования. Для исследования применены методы эпидемиологической диагностики: ретроспективный эпидемиологический анализ, описательно-оценочные методы и статистические метод.

Результаты исследования, обсуждение. По состоянию на 1 января 2017 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 22 218 случаев ВИЧ-инфекции, количество людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ) — 17 260, показатель распространенности составил 181,7 на 100 тысяч населения. Расчетное число людей, живущих с ВИЧ, согласно прогнозным данным компьютерной программы СПЕКТРУМ составляет 25 370 человек.

В 2016 г. выявлен 2391 ВИЧ-инфицированный (2015 г. — 2305). Показатель заболеваемости составил 25,2 на 100 тысяч населения (2015 г. — 24,3).

В эпидемический процесс вовлечены все регионы страны.

Наибольшее количество ВИЧ-положительных лиц проживает в Гомельской области — 6 818 человек (показатель распространенности 479,1 на 100 тысяч населения), г. Минске — 3 553 человек (показатель распространенности 181,3 на 100 тысяч населения) и Минской области — 2 671 человек (показатель распространенности 188,4 на 100 тысяч населения).

По кумулятивным данным (1987–01.01.2017) в целом по стране 37,5 % (8 330 человек) инфицировались ВИЧ парентеральным путем (при внутривенном введении наркотических веществ), удельный вес лиц, инфицирование которых произошло половым путем, составляет 60,2 % (13 385 случаев).

В 2016 г. доля парентерального пути передачи ВИЧ составила 25,1 %, на долю полового пути передачи пришлось 72,8 % случаев (рисунок 1).

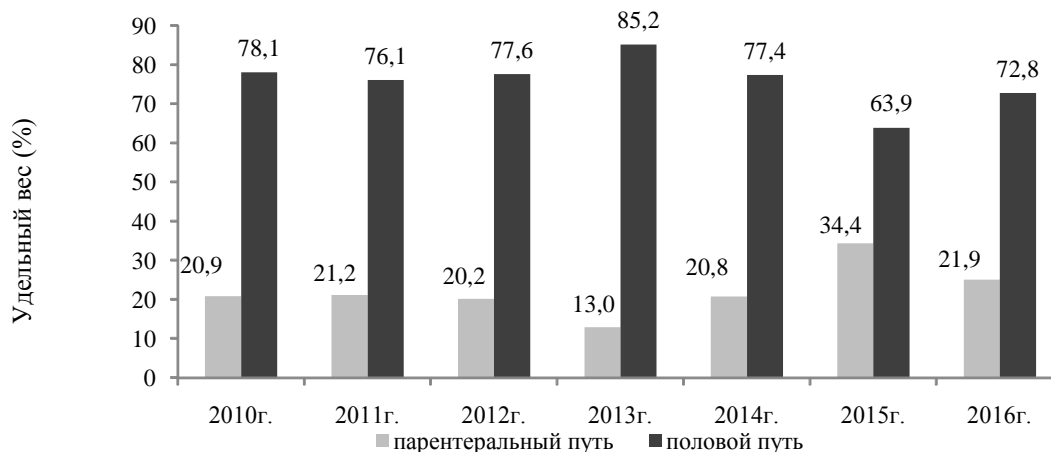


Рисунок 1. — Структура путей передачи ВИЧ в Республике Беларусь за 2010–2016 гг.

Более детальный анализ по путям передачи показал, что как для женщин, так и для мужчин преимущественно характерен половой путь инфицирования ВИЧ. В 2016 г. на долю полового пути передачи ВИЧ пришлось 81,5 % случаев, зарегистрированных среди женщин и 67,7 % случаев, зарегистрированных среди мужчин. Инъекционным путем мужчины инфицируются в 1,8 раза чаще, чем женщины (в 2016 г. 30,1 % случаев ВИЧ-инфекции у мужчин обусловлены парентеральным путем инфицирования и 16,9 % среди женщин).

В целом по республике удельный вес женщин из общего числа ВИЧ-инфицированных составляет 40,2 % (8 940 человек), мужчин — 59,8 % (13 278 человек). За 2016 г. удельный вес женщин — 37,7 % (901 человек), мужчин — 62,3 % (1 490 человек). В общей структуре инфицированных ВИЧ, соотношение мужчин и женщин составляет 1,6 к 1, в 2015 г. — 1,5 к 1.

В последние годы (2006–2016 гг.) наблюдается сдвиг распространения ВИЧ-инфекции на более старшие возрастные группы. В 2016 г. по сравнению с 2015 г. увеличился показатель заболеваемости ВИЧ-инфекцией на 100 тысяч населения в возрастной группе 40–49 лет с 33,8 до 42,0 и 50–59 лет с 10,8 до 15,2, при этом снизился показатель заболеваемости в возрастной группе 25–29 лет с 58,3 до 46,0 на 100 тысяч населения данного возраста. В Республике Беларусь не проводились исследования по изучению давности заражения ВИЧ.

Наиболее высокая распространенность ВИЧ-инфекции отмечается в возрастной группе 30–39 лет — 545,1 на 100 тысяч возрастной группы. Распространенность ВИЧ среди лиц 20–29 лет составила 131,4 случая на 100 тысяч возрастной группы. Минимальный показатель инфицированности отмечается среди подростков 15–19 лет и лиц в возрасте 60 лет и старше — 16,2 случая на 100 тысяч возрастной группы и 22,1 случая на 100 тысяч возрастной группы соответственно (рисунок 2).

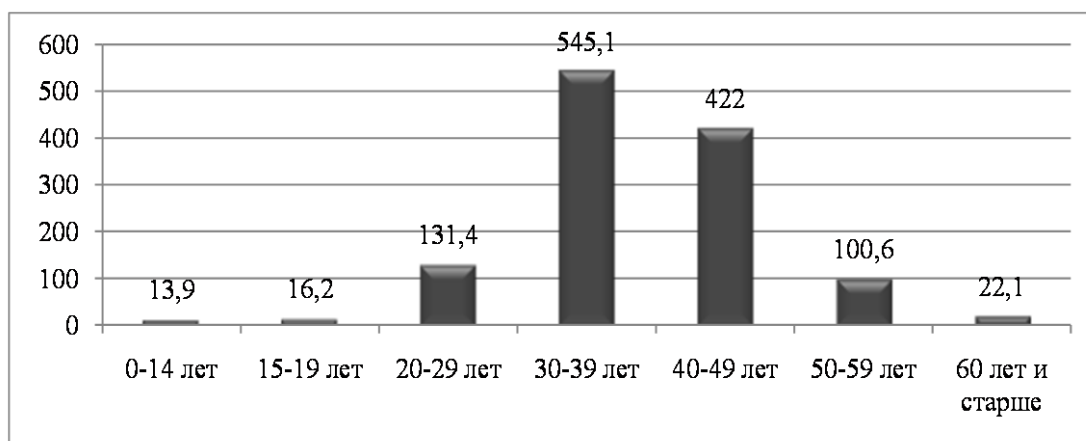


Рисунок 2. — Распространенность ВИЧ-инфекции в разных возрастных группах населения в Республике Беларусь (на 01.01.2017г.).

Также следует отметить интенсивное вовлечение в эпидемический процесс ВИЧ-инфекции женщин. В 2016 г. среди женщин 30–39 лет зарегистрировано 366 случаев или 50,9 случаев на 100 тысяч контингента, среди женщин 20–29 лет — 198 случаев или 29,9 случаев на 100 тысяч контингента. Среди девушек-подростков 15–19 лет — 12 случаев, показатель заболеваемости на 100 тысяч контингента — 5,4 случая. В возрастной группе женщин 40 лет и старше зарегистрировано 312 случаев или 15,06 случаев на 100 тысяч контингента.

Вовлечение в распространение ВИЧ-инфекции женщин детородного возраста способствует росту числа ВИЧ-экспонированных детей (если в 2006 г. от ВИЧ-позитивных матерей родилось 200 детей, то в 2016 г. — 294).

Всего за период наблюдения (с 1987 по 31.12.2016) от ВИЧ-инфицированных матерей родился 3 431 ребенок. Диагноз «ВИЧ-инфекция» подтвержден 291 ребенку, рожденному от ВИЧ-инфицированных матерей.

Созданная система профилактики передачи ВИЧ от матери ребенку в стране доказала свою эффективность. Риск передачи ВИЧ от матери ребенку снижен в 19 раз (с 26,9 % в 2000 г. до 1,4 % в 2016 г.).

Охват дородовой помощью беременных женщин в 2016 г. составил 99,8 %, тестированием на ВИЧ — 99,5 %. Более 38 % беременных женщин впервые узнали о ВИЧ-положительном статусе во время беременности.

Среди ВИЧ-положительных беременных женщин отмечается рост удельного веса женщин/ПИН с 13,7 % в 2010 г. до 15,2 % в 2016 г.

Большинство беременных женщин обращаются в дородовые консультации в первые 12 недель беременности и родоразрешаются в условиях стационара (родильных отделениях, родильных домах).

В стране обеспечен всеобщий доступ ВИЧ-положительным беременным женщинам и детям, рожденным ВИЧ-положительными матерями к антиретровирусной профилактике (далее — АРВП). С учетом полного и не полного курса АРВП в 2016 г. охвачено 98,3 % беременных женщин. Полным курсом профилактики вертикальной передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку (прием препаратов во время беременности, в родах и ребенку) по республике охвачено 90,3 % женщин (в 261 случае из 289 родивших в 2016 г.). Из 294 детей профилактикой охвачено 292, что составило 99,4 %.

В 100 % случаях дети, рожденные от ВИЧ-положительных матерей, обеспечены бесплатными адаптированными молочными смесями.

Достижения страны в сфере искоренения передачи ВИЧ от матери ребенку и врожденного сифилиса были признаны на международной арене и Республика Беларусь стала первой страной в Европейском регионе ВОЗ, подтвердившей в 2016 г. элиминацию передачи ВИЧ-инфекции и сифилиса от матери ребенку.

Заключение. Таким образом, в Республике Беларусь наблюдается тенденция к росту заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Расчетное число людей, живущих с ВИЧ, составляет 25 370 человек. Отмечается сдвиг распространения ВИЧ-инфекции на старшие возрастные группы населения (40 лет и старше) и преобладание гетеросексуального пути передачи ВИЧ. Риск передачи ВИЧ от матери ребенку в 2016 г. составил 1,4 %.

Литература

1. Результаты тестирования на ВИЧ-инфекцию и вирусные гепатиты среди групп населения с высоким риском инфицирования ВИЧ в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / ГУ РЦГиОЗ // Социологический отчет «Поведенческие особенности и уровень знаний по проблеме ВИЧ/СПИД среди ПИН, МСМ, ЖСБ». — 2016. — Режим доступа: <http://www.rcheph.by/upload/iblock/6b4/statya-den-2016-3.doc>. — Дата доступа: 28.08.2017.

EPIDEMIC SITUATION ON HIV INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

A.V. Rusanovich¹, S.V. Sergeyenko¹, I.A. Karaban², I.N. Glinskaya¹

¹Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus;

²Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

In the Republic of Belarus there is a trend towards an increase in the HIV infection morbidity. Over the past five years the rate of increase in new cases has amounted to 95.3 %. The most significant groups in the development of the epidemic process for HIV infection are injecting drug users (IDUs), female of sex work (FSW), and men who have sex with other men (MSM).

Keywords: HIV infection, morbidity, sentinel epidemiological surveillance, prevention, mother-to-child transmission of HIV.

Поступила 28.08.2017

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У ПАЦИЕНТОВ С СЕЗОННЫМИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ ЛИХОРАДКАМИ

Т.И. Самойлова¹, Ю.Б. Колтунова¹, С.А. Дракина¹, Л.М. Рустамова¹, С.Е. Яшкова²,
Е.В. Соловьева², Л.С. Цвирко³, В.А. Горбунов¹

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

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

³УО «Полесский государственный университет», Пинск, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты выявления антител к вирусу клещевого энцефалита при исследовании образцов сыворотки крови пациентов с сезонными недифференцированными лихорадочными заболеваниями методом иммуноферментного анализа за 2011–2016 гг.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, антитела, иммуноферментный анализ, иксодовые клещи, недифференцированные лихорадочные заболевания.

Введение. Клещевой энцефалит (КЭ) — трансмиссивное вирусное заболевание с затрудненной диагностикой и часто стертой клинической картиной. В последние годы отмечается повсеместный рост заболеваемости КЭ среди населения [1]. Так число диагностированных случаев клещевого энцефалита в республике по данным Министерства здравоохранения Республики Беларусь в 2011–2015 гг. в среднем составило 1,14 случаев на 100 тыс. населения [2].

Согласно данным энтомологического мониторинга, проводимого в рамках мероприятий по оценке современного состояния проблемы КЭ в Республике Беларусь, наблюдается расширение ареала обитания иксодовых клещей — переносчиков клещевого энцефалита. Так, инфицированность иксодовых клещей в 2000–2015 гг. составила в среднем 17,3 % для представителей *Ixodes ricinus* и 10,6 % — для *Dermacentor reticulatus* [3]. Такая ситуация создает предпосылки для проведения мониторинговых исследований, направленных на выявление антител к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) среди населения с лихорадочными заболеваниями неясного генеза.

Целью настоящего исследования явилось выявление антител к ВКЭ у пациентов с сезонными недифференцированными лихорадочными заболеваниями в 2011–2016 гг.

Материалы и методы. Материалом для выявления антител к ВКЭ стали сыворотки крови, взятые у пациентов с недифференцированными лихорадочными заболеваниями в эпидсезон (май — октябрь). За указанный период материал поступал из всех областей республики.

Выявление антител к ВКЭ проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Российская Федерация) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты и обсуждение. Всего за указанный период было исследовано 796 образцов сывороток крови, взятых у пациентов, обратившихся в учреждения здравоохранения с симптомами вирусной инфекции, предположительно арбовирусной природы (таблица).

Таблица — Количество сывороток, исследованных в ИФА на антитела к ВКЭ в 2011—2016 гг.

Годы Области	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2011–2016
Брестская	55	9	15	58	-	3	140
Витебская	34	4	-	12	-	1	51
Гомельская	87	4	1	57	3	-	152
Гродненская	27	12	-	52	-	-	91
Могилевская	21	14	10	124	6	3	178
Минская	37	8	12	17	6	-	80
г. Минск	61	20	13	9	-	1	104
Всего по РБ	322	71	51	329	15	8	796

Как видно из таблицы, больше всего материала было взято из Брестской области — 140 образцов (17,6 %), Гомельской области — 152 образца (19,1 %), Могилевской области — 178 образцов (22,4 %), а также из г. Минска — 104 образца (13,1 %), что соответствует данным о зараженности переносчиков ВКЭ на этих территориях республики. Из числа исследованных сывороток положительный результат на наличие антител к вирусу КЭ дали 50 образцов, что составило 6,28 % от общего количества (рисунок 1).

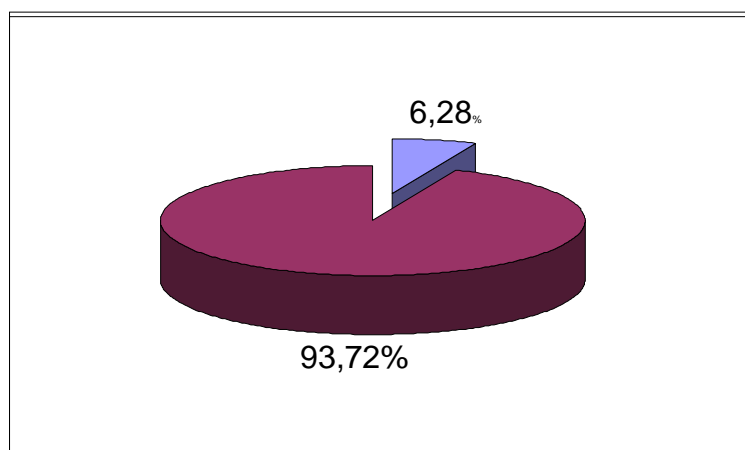


Рисунок 1. — Процент сывороток крови, давших положительный результат на IgG гк ВКЭ в ИФА

На рисунке 2 приведен результат исследования сывороток крови в ИФА по годам. Из рисунка следует, что процент сывороток крови, положительных на антитела к ВКЭ в 2011–2016 гг., составлял от 0 (2015 г.) до 12,5 % (2016 г.) (рисунок 2).

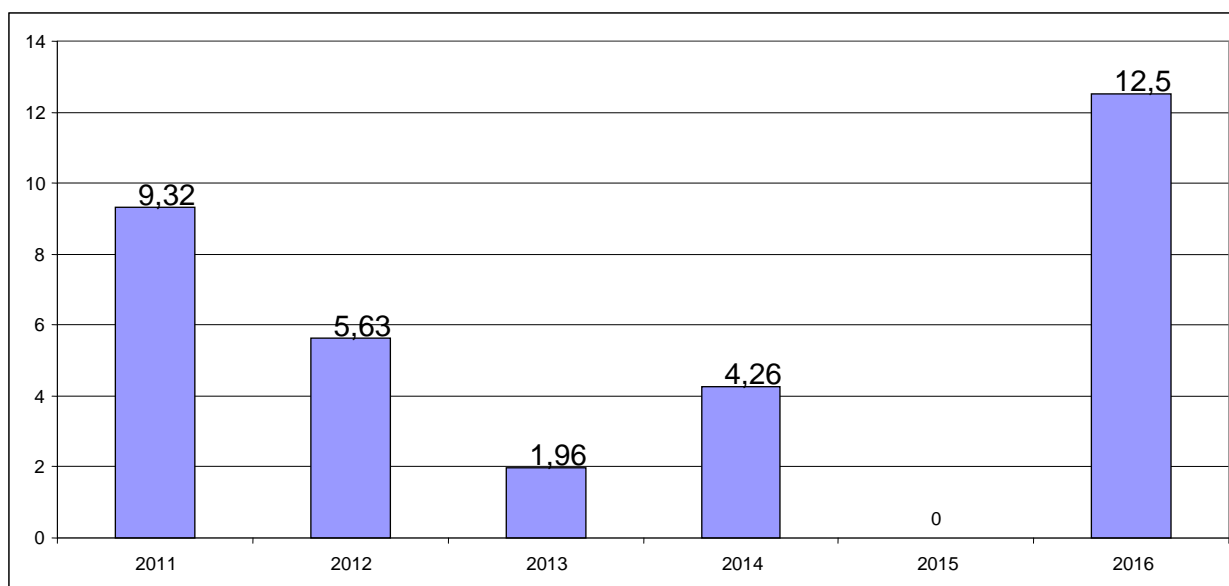


Рисунок 2. — Процент сывороток крови, положительных на антитела к вирусу КЭ в ИФА (по годам)

Распределение сывороток крови, положительных на антитела к вирусу КЭ по областям в 2011–2016 гг., также было различным. Процент положительных сывороток составлял от 3,37 % по Могилевской области до 7,84 % — по Витебской области. На территории г. Минска процент положительных сывороток составлял 7,69 % (рисунок 3).

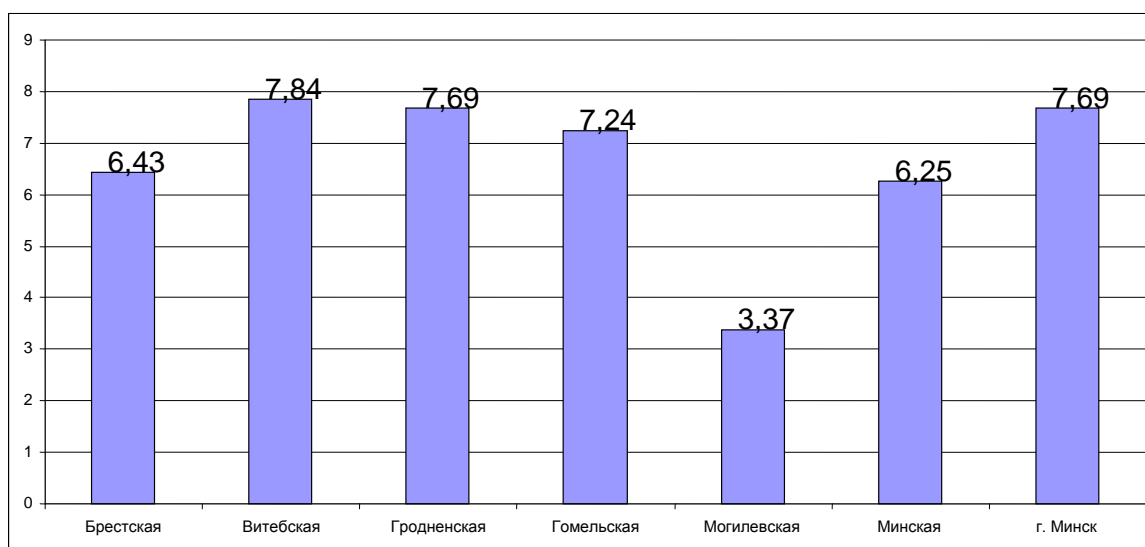


Рисунок 3. — Процент сывороток крови, положительных на антитела к вирусу КЭ в ИФА (по областям)

Заключение. За рассматриваемый период (2011–2016 гг.) нами было исследовано в реакции ИФА 796 образцов сыворотки крови от пациентов. 50 образцов дали положительный результат на антитела к ВКЭ, что, с учетом данных Министерства здравоохранения Республики Беларусь о заболеваемости КЭ среди населения свидетельствует о сохранении устойчивых очагов циркуляции ВКЭ на территории республики. Кроме того полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего проведения мониторинга и усиления контроля за сезонными трансмиссивными инфекциями, в частности — за клещевым энцефалитом, на территории Республики Беларусь.

Литература

1. Проблема клещевого энцефалита в Республике Беларусь и его генодиагностика / Т.И. Самойлова [и др.] // Молекулярная диагностика инфекционных болезней: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск 17–18 мая 2007 г. — Минск, 2007. — С. 191–192.
2. Здравоохранение в Республике Беларусь: офиц. статист. сб. за 2015 г. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — 281 с.
3. Инфицированность иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека [Электронный ресурс]: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — Вып. 9. — С. 158–159. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

DETECTION OF ANTIBODIES TO TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN PATIENTS WITH SEASONAL UNDIFFERENTIATED FEBRILE DISEASES

T.I. Samoilo¹, Yu.B. Koltunova¹, S.A. Drakina¹, L.M. Rustamova¹, S.E. Yashkova², E.V. Solov'eva², L.S. Tsvirko, V.A. Gorbunov¹

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;

²Republican Centre for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus;

³Polesky State University, Pinsk, Belarus

In the paper the results of ELISA detection of antibodies to tick-borne encephalitis virus in serum samples from patients with seasonal undifferentiated febrile diseases at 2011–2016 are presented.

Keywords: ixodes ticks, contamination, antibodies, tick-borne encephalitis virus, undifferentiated febrile disease, ELISA.

Поступила 10.10.2017

ИЗУЧЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ ЗА 2014–2016 гг.

Т.И. Самойлова¹, А.Г. Красько¹, О.С. Залевская¹, С.Е. Яшкова², В.Н. Косолапова¹, Ю.Б. Колтунова¹, Е.В. Соловьева², Л.С. Цвирко³, Т.А. Сеньковец³

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

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

³УО «Полесский государственный университет», Пинск, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты изучения зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Беларуси за период 2014–2016 гг.

Ключевые слова: иксодовые клещи, зараженность, вирус клещевого энцефалита, Республика Беларусь.

Введение. 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), имеющего высокую чувствительность и не уступающему методу биопробы на животных [3].

В работе приведены результаты исследования иксодовых клещей, собранных на территории республики в период 2014–2016 гг., на выявление антигена вируса КЭ.

Цель работы — изучение зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Республике Беларусь за период 2014 — 2016 гг.

Материал и методы. Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранные на территории всех областей республики в 2014–2016 гг. Методом ИФА было исследовано 1762 экземпляра (325 биопроб) *I. ricinus* и 591 экземпляр (103 биопробы) *D. reticulatus* из природных очагов. Перед постановкой ИФА иксодовых клещей подвергали первичной биологической обработке. Клещей распределяли по биопробам в зависимости от их вида, пола, стадии развития, степени насыщения. В одну биопробу брали 10–15 экземпляров голодных или полунапитавшихся самок; 10 голодных самцов; 2–5 напитавшихся самок или 50–100 нимф иксодовых клещей. Далее членистоногих отмывали фосфатным буферным раствором (рН 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии [4, 5]. 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, методом ИФА антиген вируса КЭ в целом по республике выявлялся в клещах *I. ricinus* в 15,0 %, а в *D. reticulatus* — в 11,6 % (таблица).

Таблица — Характеристика зараженности иксодовых клещей антигеном вируса клещевого энцефалита в Беларуси по ИФА (2014–2016 гг.)

Области	<i>Ixodes ricinus</i>			<i>Dermacentor reticulatus</i>		
	биопроб/ экз.	Кол-во полож.	% положи- тельных	биопроб/ экз.	Кол-во полож.	% положи- тельных
Витебская	66/288	10	15,1	2/7	0	0
Могилевская	40/292	5	12,5	4/36	1	25,0
Гродненская	47/212	7	14,8	49/288	5	10,2
Минская	50/349	8	16,0	9/38	1	11,1
Брестская	44/258	9	20,4	0	0	0
Гомельская	32/202	4	12,5	30/195	5	16,7
г. Минск	46/161	6	13,0	9/27	0	0
Всего по РБ	325/1762	49	15,0	103/591	12	11,6

Примечание: в числителе — количество исследованных биопроб, в знаменателе — количество экземпляров.

Как видно из таблицы, процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* за 2014–2016 гг. составил: по Витебской — 15,1; по Могилевской — 12,5; по Гродненской — 14,8; по Минской — 16,0; по Брестской — 20,4; по Гомельской — 12,5, и по г. Минску — 13,0. В клещах *D. reticulatus* процент антигена вируса КЭ составил по

Минской — 11,1; по Могилевской — 25,0; по Гродненской — 10,2; по Гомельской — 16,7. Из других областей и г. Минска клещи *D. reticulatus* были собраны либо в малых количествах, либо вообще не поступали для исследования.

На рисунке 1 приведен процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus*.

Как видно из рисунка 1, наиболее высокая зараженность клещей *I. ricinus* была отмечена по Брестской (20,4 %) и Минской (16,0 %) областям.

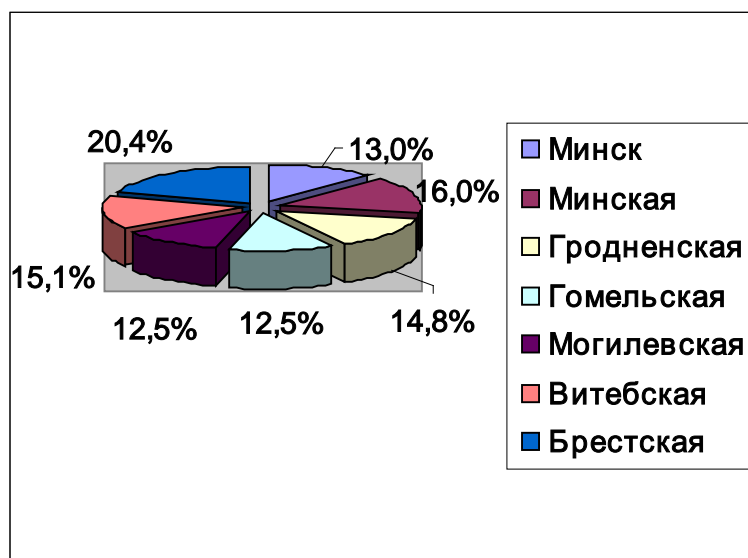


Рисунок 1. — Обнаружение антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus*

На рисунке 2 приведен процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *D. reticulatus*.

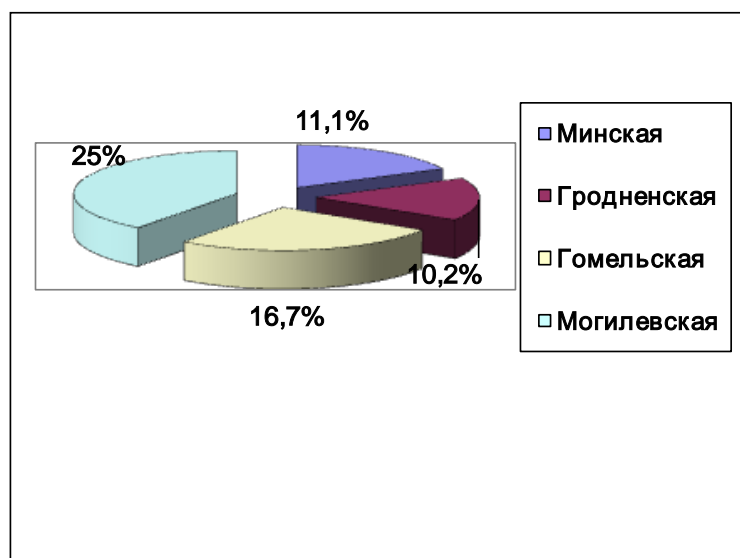


Рисунок 2. — Выявление антигена вируса КЭ в клещах *D. reticulatus*

На рисунке 2 показано, что наиболее высокая зараженность клещей *D. reticulatus* выявлена в Могилевской (25,0 %) и Гомельской (16,7 %) областях.

Зараженность иксодовых клещей по годам приведена на рисунке 3.

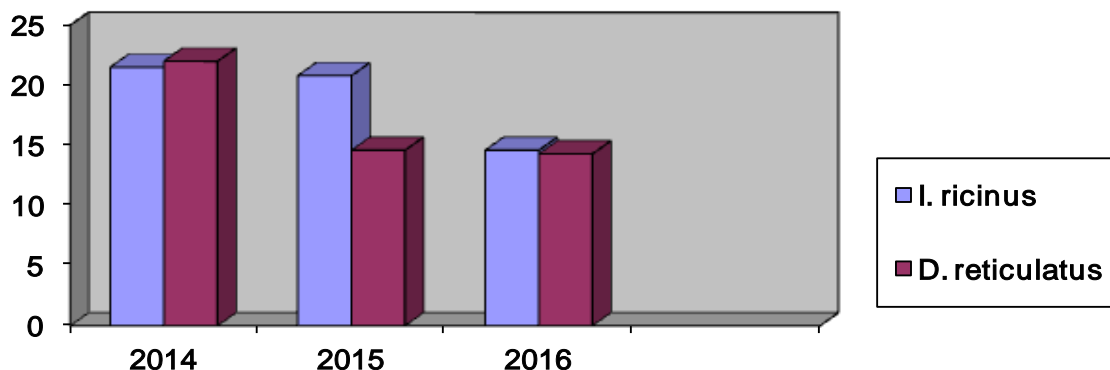


Рисунок 3. — Динамика выявления антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА (% положительных проб) по годам

Как видно из рисунка 3, процент выявления антигена вируса КЭ в иксодовых клещах видов *I. ricinus* и *D. reticulatus* за указанный период оставался на высоком уровне и составлял: в 2014 г. — 21,5 % и 22,0 %; в 2015 г. — 20,8 % и 14,6 %; в 2016 г. — 15,2 % и 14,3 % соответственно.

Заключение. На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что зараженность иксодовых клещей в Республике Беларусь за последние 3 года на всей территории по областям остается достаточно высокой и составляет для *I. ricinus* — 15,0 %, а для *D. reticulatus* — 11,6 %.

В целом, текущая эпидобстановка по КЭ, а также ситуация на ближайшую перспективу оценивается как нестабильная, зависящая от климатогеографических условий, численности переносчиков и их вирусофорности, а также посещаемости населением мест естественного обитания клещей.

Литература

1. Самойлова, Т. И. Современное состояние проблемы арбовирусных инфекций в Республике Беларусь / Т. И. Самойлова // Вестник Уральской государственной медицинской академии (Екатеринбург). — 2010. — Вып. 21. — С. 133–141.
2. Львов, Д. К. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе / Д. К. Львов, В. И. Злобин // Вопр. вирусологии. — 2007 — № 5. — С. 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.: ВИНТИ. — 1991. — Т. 25. — 111 с.
5. Методы и средства контроля за природными очагами арбовирусных инфекций с комплексом профилактических мероприятий по защите населения от заражения клещевыми и комариными инфекциями: инструкция по применению / сост.: Т. И. Самойлова [и др.]. — Минск, 2012. — 20 с.

INVESTIGATION OF IXODES TICKS INFECTIOUSNESS BY TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN BELARUS IN 2014–2016

T.I. Samoilova¹, A.G. Krasko¹, O.S. Zaleuskaya¹, S.E. Yashkova², V.N. Kosolapova¹, Yu.B. Koltunova¹, E.V. Solov'eva², L.S. Tsvirko³, S.E. Senkovets³

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;

²Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus;

³Polessky State University, Pinsk, Belarus

In the paper the results of studies of ixodes ticks infectiousness by tick-borne encephalitis virus in Belarus for the period from 2014 to 2016 are presented.

Keywords: ixodes ticks, infection, tick-borne encephalitis virus, Republic of Belarus.

Поступила 10.10.2017

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ БЕЛАРУСИ

Самойлова Т.И.¹, Красько А.Г.¹, Залевская О.С.¹, Яшкова С.Е.², Косолапова В.Н.¹, Рустамова Л.М.¹, Цвирко Л.С.³, Соловьева Е.В.², Петкевич А.С.¹

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

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

³Полесский государственный университет, Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты исследования кровососущих комаров и мошек, собранных на территории всех областей Республики Беларусь за период 2014–2016 гг., на зараженность их вирусом Западного Нила.

Ключевые слова: кровососущие комары, мошки, вирус Западного Нила, антиген.

Введение. Наряду с возбудителем клещевого энцефалита, наибольшую эпидемиологическую значимость среди арбовирусов для республики имеет вирус Западного Нила (ЗН) [1, 2]. Вирус ЗН относится к роду *Flavivirus*, семейства *Flaviviridae* и принадлежит к антигенному комплексу японского энцефалита [3]. Переносчиками вируса являются кровососущие комары, клещи, а также имеются сведения о роли мошек в циркуляции вируса [3]. Природные очаги Западно-Нильской инфекции зарегистрированы практически повсеместно в Африке, а также в странах Европейского Средиземноморья, Ближнего Востока, Средней Азии, на Кавказе, Индийском субконтиненте, в Индонезии, Малайзии, Таиланде и других тропических государствах. На Американском континенте вирус ЗН был впервые выявлен в 1999 г. [4]. В Европе вирус ЗН был выделен в 60-х гг. (Франция, Россия) от людей, комаров и клещей, хотя наличие антител к вирусу было обнаружено в крови жителей Албании еще в конце 50-х гг. [5]. В настоящее время различными исследователями выделяются изоляты вируса ЗН во многих странах мира [6–8]. 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, 8–11]. На территории Беларуси вирус впервые был выделен и идентифицирован в 1985 г. от птиц (штамм

48–ЗН Тремля). Позже вирус был изолирован от кровососущих комаров рода *Aedes* и из крови лихорадящего больного, проживающего на территории Беловежской пуши [1].

Цель работы — выявление и выделение антигена вируса Западного Нила из кровососущих комаров и мошек, собранных на территории Республики Беларусь за 2014–2016 гг.

Материал и методы. Материалом для исследования служили кровососущие комары и мошки, собранные во всех областях республики за период 2014–2016 гг. Всего было взято для исследования 13 678 экземпляров (206 биопроб) 3-х родов: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* и 21 биопроба мошек.

Выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах и мошках осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Перед постановкой ИФА проводили подготовку биопроб: биопробы кровососущих комаров отмывали 70 % спиртом, а затем трехкратно фосфатным буферным раствором с добавлением антибиотика. Для приготовления суспензии членистоногих тщательно растирали и к гомогенатам добавляли фосфатный буферный раствор из расчета 0,8 мл на 20 комаров. Осветленную надосадочную жидкость использовали в ИФА. ИФА проводили с применением набора реагентов для выявления антигенов вируса Западного Нила методом иммуноферментного анализа производства института вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва, Россия).

Результаты и обсуждения. Проведенные исследования кровососущих комаров и мошек, собранных в природных очагах на территории всех областей республики, позволили выявить зараженность кровососущих комаров вирусом Западного Нила (таблица).

Таблица — Зараженность кровососущих членистоногих (комаров и мошек) антигеном вируса Западного Нила в 2014–2016 гг.

Области	Кровососущие комары		Мошки	
	Количество б/п /к-во полож.	% полож. б/п	Количество б/п /к-во полож.	% полож. б/п
1. Витебская	31/3	9,7	6/0	0
2. Могилевская	36/2	5,6	4/0	0
3. Гродненская	35/3	8,6	2/0	0
4. Минская	34/2	5,9	1/0	0
5. Брестская	28/4	14,3	3/0	0
6. Гомельская	25/4	16,0	5/0	0
7. Минск	17/0	—	—	—
Всего по РБ	206/18	8,7	21/0	0

Примечание: в числителе — количество исследованных биопроб, в знаменателе — число положительных.

Как видно из таблицы, процент выявления антигена вируса ЗН в кровососущих комарах за 2014–2016 гг. составлял: по Витебской — 9,7; по Могилевской — 5,6; по Гродненской — 8,6; по Минской — 5,9; по Брестской — 14,3; по Гомельской — 16,0, и по г. Минску 0 %. В мошках антиген вируса ЗН не был выявлен. Зараженность кровососущих комаров вирусом ЗН в целом по Республике Беларусь за три года составила 8,7 %.

Наибольший процент содержания антигена вируса отмечен у комаров р. *Anopheles* — 10,4 %. Доля положительных биопроб кровососущих комаров р. *Aedes* составила — 9,1 %, а р. *Culex* — 6,1 % (рисунок 1).

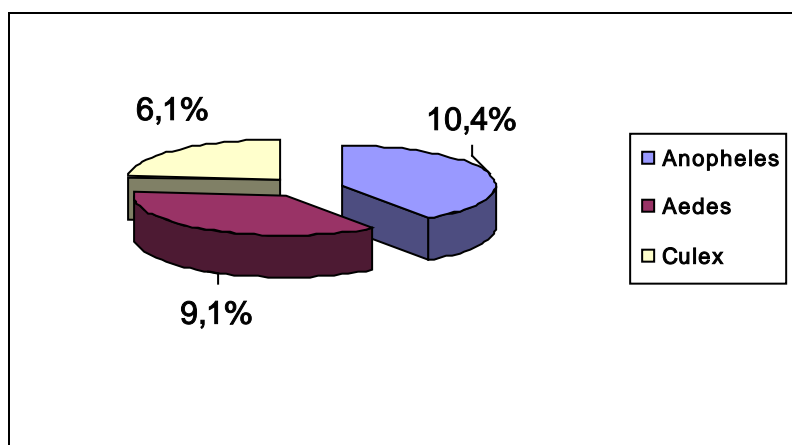


Рисунок 1. — Выявление антигена вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по родам

Как видно из рисунка 1, в период с 2014 по 2016 гг. наибольшее значение, как переносчики вируса ЗН, имели комары рода *Anopheles*.

Процент зараженности кровососущих комаров всех родов вирусом ЗН по областям приведен на рисунке 2.

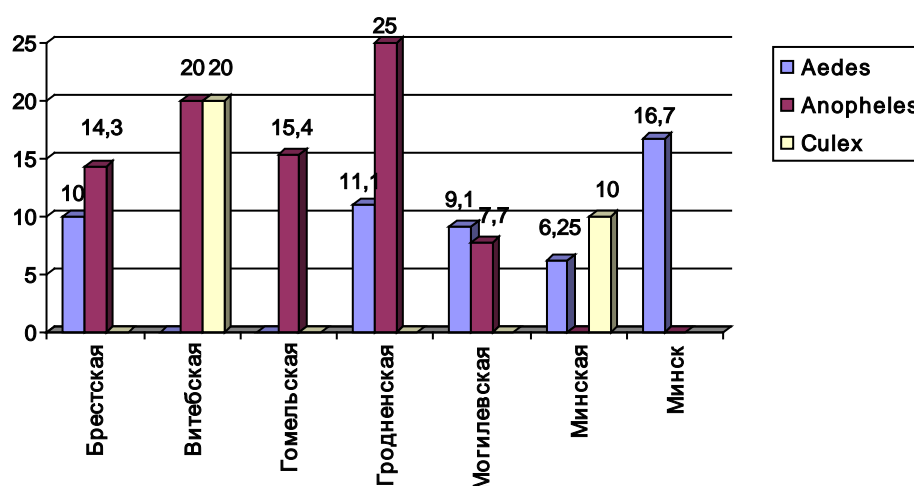


Рисунок 2. — Выявление антигена вируса ЗН в комарах рр. *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* по областям

Как видно из рисунка 2, наибольший процент зараженности комаров рода *Anopheles* антигеном вируса ЗН наблюдается в Гродненской (25 %), а наименьший — в Могилевской области (7,7 %). Комары рода *Aedes*, отловленные на территории г. Минска, характеризуются высокой (16,7 %) зараженностью антигеном вируса ЗН. Наибольший процент зараженности комаров рода *Culex* наблюдается на территории Витебской (20 %) области.

На рисунке 3 показан общий процент зараженности комаров по областям.

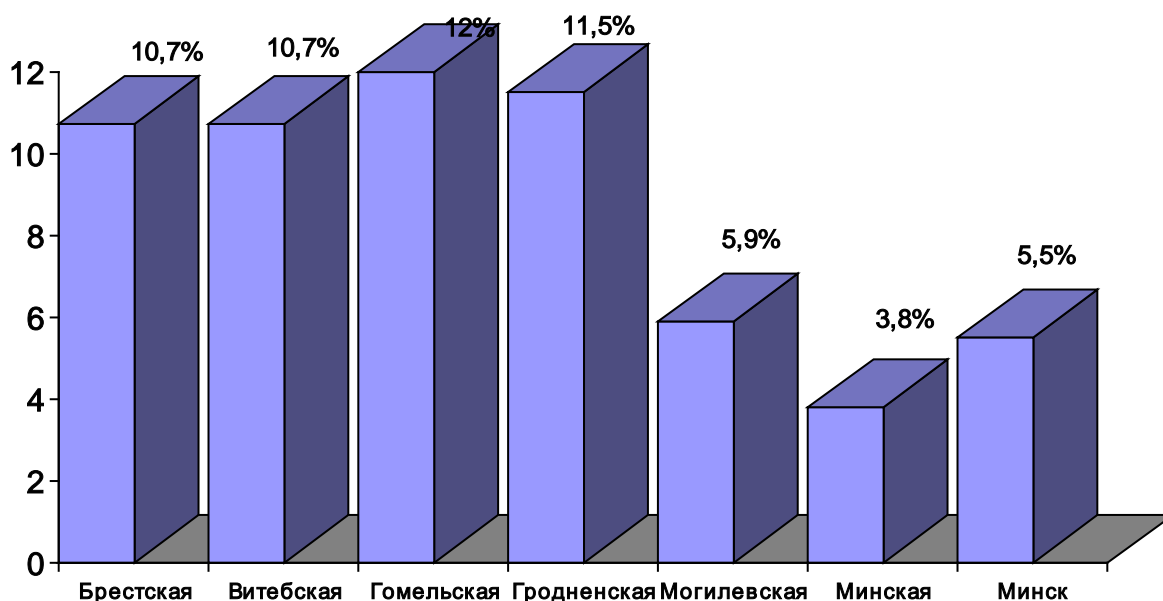


Рисунок 3. — Процент зараженности комаров на территории Республики Беларусь в 2014–2016 гг. по областям

Как видно из рисунка 3, наиболее высокий процент зараженности был выявлен в комарах, отловленных на территории Гомельской (12 %) и Гродненской (11,7 %) областях.

Заключение. На основании проведенного анализа зараженности кровососущих комаров и мошек Беларуси за период 2014–2016 гг., можно сделать вывод, что зараженность кровососущих комаров антигеном вируса ЗН остается на значимом уровне и составляет в среднем по РБ 8,7 %.

Антиген вируса ЗН обнаруживается в кровососущих комарах всех трех исследуемых родов (*Aedes*, *Anopheles* и *Culex*), при этом наиболее высокий процент (10,4 %) выявляется в комарах рода *Anopheles*.

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. Львов, Д. К. Арбовирусы и арбовирусные инфекции / Д. К. Львов, С. М. Клименко, С. Я. Гайдамович. — М. : Медицина, 1989. — С. 5–6.
4. West Nile Virus outbreak of 1999 in New York: the Flushing Hospital experience / D. S. Asnis [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 30, No. 3. — P. 413–418.
5. 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.
6. Samoiloва, T. I. Virologic and serologic investigation of West Nile virus circulation in Belarus / T. I. Samoiloва, V. I. Votyakov, L. P. Titov // Centr. Eur. J. Public Health. — 2003. — Vol. 11, No. 2. — P. 55–62.4
7. Nosal, B. West Nile virus / B. Nosal, R. Pellizzari // Can. Med. Assoc. J. — 2003. — Vol. 168, No. 11. — P. 1443–1444.
8. 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.

9. Венгеров, Ю. А. Лихорадка Западного Нила / Ю. А. Венгеров, А. Е. Платонов // Лечащий врач. — 2000. — № 10. — С. 56–60.

10. Zeller, H. G. West Nile virus: an overview 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.

11. 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.

WEST NILE VIRUS INFECTION IN BLOOD-SUCKING MOSQUITOES AND MIDGES IN NATURAL FOCI IN OF BELARUS

T.I. Samoilova¹, A.G. Krasko¹, O.S. Zaleuskaya¹, S.E. Yashkova², V.N. Kosolapova¹, L.M. Rustamova¹, L.S. Tsvirko³, E.V. Solov'eva²

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;

²Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus;

³Polessky State University, Pinsk, Belarus

In the paper results of West Nile virus antigen detection in blood-sucking mosquitoes and midges collected in the territory of the Republic of Belarus in 2014–2016 are presented.

Keywords: blood-sucking mosquitoes, midges, West Nile virus, antigen, Belarus.

Поступила 10.10.2017

БОКАВИРУС В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Н.В. Сивец, Н.П. Шмельёва, Н.В. Грибкова, Т.П. Лано

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

Резюме. В данной работе представлена этиологическая структура острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) за семилетний период исследования в Республике Беларусь, определен вклад бокавируса в развитие респираторной патологии у госпитализированных детей, а также изучена динамика проявления инфекционного процесса, связанного с бокавирусом человека. Показано, что в этиологической структуре ОРВИ среди госпитализированных детей преобладали риновирусы и вирусы гриппа. Бокавирус стал четвертым по частоте встречаемости среди респираторных вирусов, заболевания бокавирусной этиологии составили 11,8 %.

Ключевые слова: бокавирус человека, частота выявления, ОРВИ, Беларусь.

Введение. Впервые бокавирус человека (HBoV) был описан в 2005 г. в Швеции сотрудниками Каролинского института. Исследователи использовали технологию молекулярного скрининга для обнаружения новых вирусов в клиническом материале. Согласно генетической организации и гомологии последовательностей вирус вначале был условно отнесен к семейству *Parvoviridae*, подсемейству *Parvovirinae*, роду *Vocavirus* [1, 2]. Ранее, помимо HBoV, к роду бокавирус относились два вируса: парвовирус быка (bovine parvovirus, BPV) и парвовирус собак (canine minute virus,

CMV). Оба вируса были связаны с респираторными и кишечными заболеваниями молодых животных. Открытие бокавирусов у других видов животных, совершенствование молекулярных методов диагностики и филогенетического анализа привело к изменению классификации семейства *Parvoviridae*. Согласно современной классификации Международного комитета по таксономии вирусов бокавирус человека относится к семейству *Parvoviridae*, подсемейству *Parvovirinae*, роду *Vocaparvovirus* [3].

Геном вируса представлен одноцепочечной линейной отрицательной молекулой ДНК длиной ~5300 п.н. Симметрично на концах генома расположена последовательность инвертированных концевых повторов (Inverted Terminal Repeat, ITR) в размере 32–52 п.н., которые необходимы для интеграции и репликации ДНК вируса в геном клетки хозяина.

В настоящее время различают 4 генотипа вируса: HBoV1, HBoV2, HBoV3, HBoV4. HBoV1 является причиной респираторных заболеваний у детей, HBoV2–4 наиболее часто выявляется у пациентов с симптомами гастроэнтерита [4]. Генетический материал HBoV1 был также выявлен в сыворотке, фекалиях, моче, слюне и спинномозговой жидкости [5]. Исследования ткани аденоидов у детей методом ПЦР после проведенной аденотомии показали наличие ДНК HBoV1 в 5 % — 32 % образцах. У взрослых пациентов, подвергающихся плановой хирургии при хроническом синусите, HBoV1 выявлен в 17,6 % образцах материала из придаточных пазух носа и полипов [8].

Результаты исследований показали, что ДНК HBoV1 чаще всего обнаруживался у маленьких детей первых лет жизни. Частота выявления генетического материала вируса в клиническом материале у взрослых пациентов не превышала 1 %. Наиболее восприимчивыми к HBoV1–инфекции среди взрослого населения оказались пожилые люди в возрасте старше 60 лет. У этой возрастной группы заболевание протекало в более тяжелой форме, чем у детей [6, 7].

Таким образом, несмотря на то, что с момента открытия HBoV1 появилось много эпидемиологических, молекулярно-генетических данных вопрос о роли вируса в патогенезе при заболеваниях дыхательных путей остается нерешенным. Отсутствие доступной модели для культивирования вируса ограничивает возможности для более детального изучения возбудителя. Частота выявления бокавируса в клиническом материале разными исследователями значительно варьирует в зависимости от чувствительности метода диагностики, географического местоположения исследования, выборки пациентов и т.д. В нашей стране развитие инфекционного процесса с участием HBoV1 также недостаточно изучено.

Цель исследования. Выявить закономерности эпидемиологического процесса и вклад респираторного бокавируса в этиологическую структуру ОРВИ у госпитализированных детей на территории нашей страны.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили назофарингиальные мазки, полученные от детей в возрасте от 0 до 18 лет, госпитализированных с острыми заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей в период с октября 2010 по октябрь 2017 гг. В работе использовали клинический материал из всех административных районов страны. Исследования проводились в рамках дозорного надзора за гриппом и другими ОРВИ в соответствии с Санитарными нормами, правилами и гигиеническими нормативами «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь» от 12 октября 2010 года № 132 [9]. За период исследования на наличие генетического материала респираторных вирусов проанализировано 3 416 образцов. В сезон 2010–11 гг. исследовали 484 образца, 2011–12 гг. — 482, 2012–13 гг. — 478,

2013–14 гг. — 658, 2014–15 гг. — 417, 2015–16 гг. — 416, 2016–17 гг. — 481. Из Брестской области проанализировано 314 образцов, из Витебской области — 568, Гомельской области — 541, Гродненской области — 231, Минской области — 433, Могилевской области — 399 и г. Минска — 930 образцов. Мазки собирали в транспортную среду и хранили при температуре минус 20°C до проведения исследования. Доставка образцов в лабораторию гриппа и гриппоподобных заболеваний осуществлялась с соблюдением холодной цепи в соответствии с инструкцией «Комплексная диагностика гриппа» от 18.01.2011 № 121–1210 [10]. Полученные образцы анализировали на наличие генетического материала следующих респираторных вирусов: гриппа типа А и типа В, парагриппа 1–4 типа (ПГ), респираторно-синцитиального вируса (РС), метапневмовируса (МПВ), риновируса (РВ), аденовируса (АД), коронавируса (КоВ) и бокавируса человека (БВ).

Выделение ДНК и РНК респираторных вирусов проводили с использованием наборов «Рибо-сорб» («АмплиСенс», Российская Федерация), «НуклеСорб» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь). Выявление генетического материала респираторных вирусов проводили с использованием следующих наборов: производства «АмплиСенс» «Influenza virus A/B-FL», «ОРВИ-скрин» (Российская Федерация), производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии «ОРВИ-ген», «ФЛУ-ген» (Республика Беларусь). Исследования выполняли согласно инструкциям производителей. Амплификацию и анализ результатов исследований проводили на приборе Rotor Gene 6000, Corbett research (Австралия).

Для статистического анализа результатов использовали пакет прикладных программ Statistica v.6.0. Рассчитывали частоту встречаемости случаев в %. Достоверные различия частоты встречаемости случаев в несвязанных выборках рассчитывали по критерию χ^2 (хи-квадрат) Пирсона. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. За данный период исследовано 3416 образцов от госпитализированных детей в возрасте от 0 до 18 лет (0–1 года — 750 (22,0 %), с 1 года до 3 лет — 1 166 (34,1 %), с 3 до 7 лет — 728 (21,3 %), старше 7 лет — 772 (22,6 %)).

Генетический материал респираторных вирусов выявлен в 2423 случаях (70,9 %). Частота выявления респираторных вирусов в клинических образцах у госпитализированных детей за данный период исследования представлена на рисунке 1.

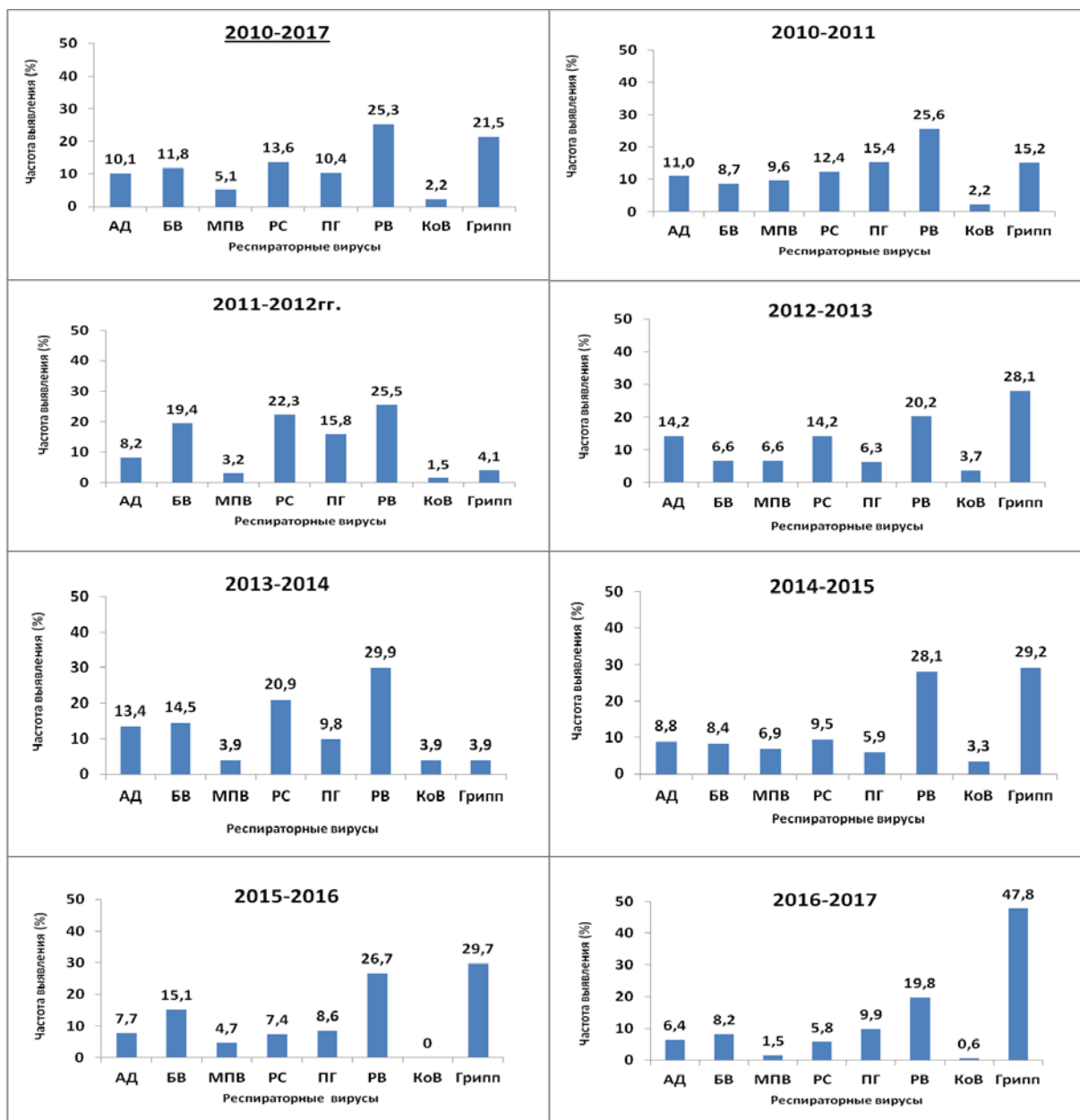


Рисунок 1. — Частота встречаемости респираторных вирусов в этиологической структуре ОРВИ в период 2010–2017 гг.

Результаты семилетних исследований показали, что в этиологической структуре всех верифицированных ОРВИ у госпитализированных детей ведущим инфекционным агентом стал риновирус, который был выявлен у 612 детей (25,3 %). Следующим по частоте встречаемости в структуре ОРВИ стал вирус гриппа. За время исследования генетический материал вируса гриппа обнаружен у 522 (21,5 %) пациентов. Генетический материал других вирусов (парагриппа, метапневмовируса, РС-вируса, аденовируса и коронавируса) детектировали в 10,4 %, 5,1 %, 13,7 %, 11,2 % и 2,2 % соответственно ($p < 0,05$).

Бокавирус как этиологический агент острого респираторного заболевания обнаружен у 285 (11,8 %, $p < 0,05$) пациентов. Наиболее высокий уровень бокавирусной инфекции зарегистрирован в сезон 2011–12 гг. — 19,4 %, самый низкий 6,6 % отмечен в 2013–14 гг. За анализируемый период прослеживается четкая тенденция циклического течения эпидемического процесса при бокавирусной инфекции с наличием периодов

с высокими и низкими показателями заболеваемости. Это может быть обусловлено инфекционно — иммунологическими взаимоотношениями. В периоды высокой заболеваемости происходит естественная иммунизация населения. Возросшая доля иммунных начинает препятствовать циркуляции возбудителя и заболеваемость на начинает снижаться. Пополнение населения неиммунными за счет рождаемости, миграционных процессов, формирования различных организованных коллективов и снижения у части населения иммунитета создает предпосылки для повышения вирулентности циркулирующих возбудителей (за счет селекции в популяции хозяина) приводит к очередному росту заболеваемости.

Анализ частоты выявления бокавирусной инфекцией за семилетний период по административным регионам страны показал, что на протяжении всего периода исследования лидировала Витебская область (18,9 %, $p < 0,05$) и г. Минск (34,7 %, $p < 0,05$) (рисунок 2).

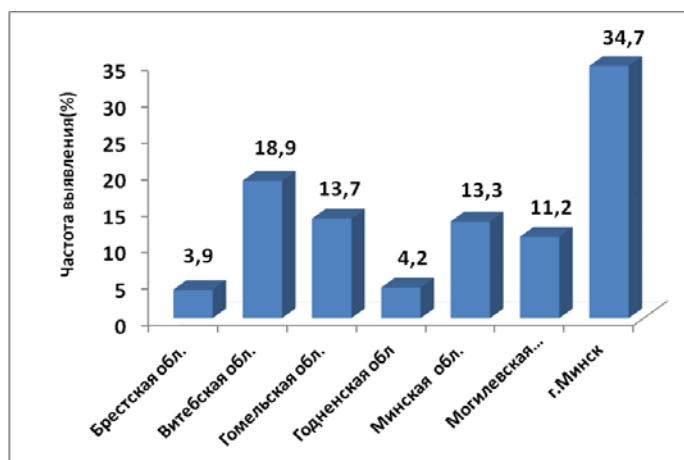


Рисунок 2. — Частота выявления бокавируса на территории республики в период 2010–2017 гг.

Отличие в уровнях заболеваемости бокавирусной инфекции на различных территориях страны могут быть связаны с особенностями выявления и регистрации случаев, автономностью развития эпидемиологического процесса или с другими объективными различиями. Высокая частота выявления бокавируса в г. Минске может быть связана с тем, что в более крупных мегаполисах эпидемический процесс формируется и развивается быстрее и интенсивнее по сравнению с небольшими населенными пунктами. Особенности динамики инфекционного процесса бокавирусной инфекции на территории страны свидетельствовали о том, что постоянные и периодические факторы, влияющие на многолетнюю динамику заболеваемости, были аналогичными, но отличались по силе.

Подъем заболеваемости, ассоциированной с разными респираторными вирусами значительно варьировался и имел выраженную сезонность (рисунок 3)

Коронавирусы и РС-вирус достоверно чаще регистрировались в зимний период, для метаневмовируса отмечена активность как в зимний, так и весенний период.

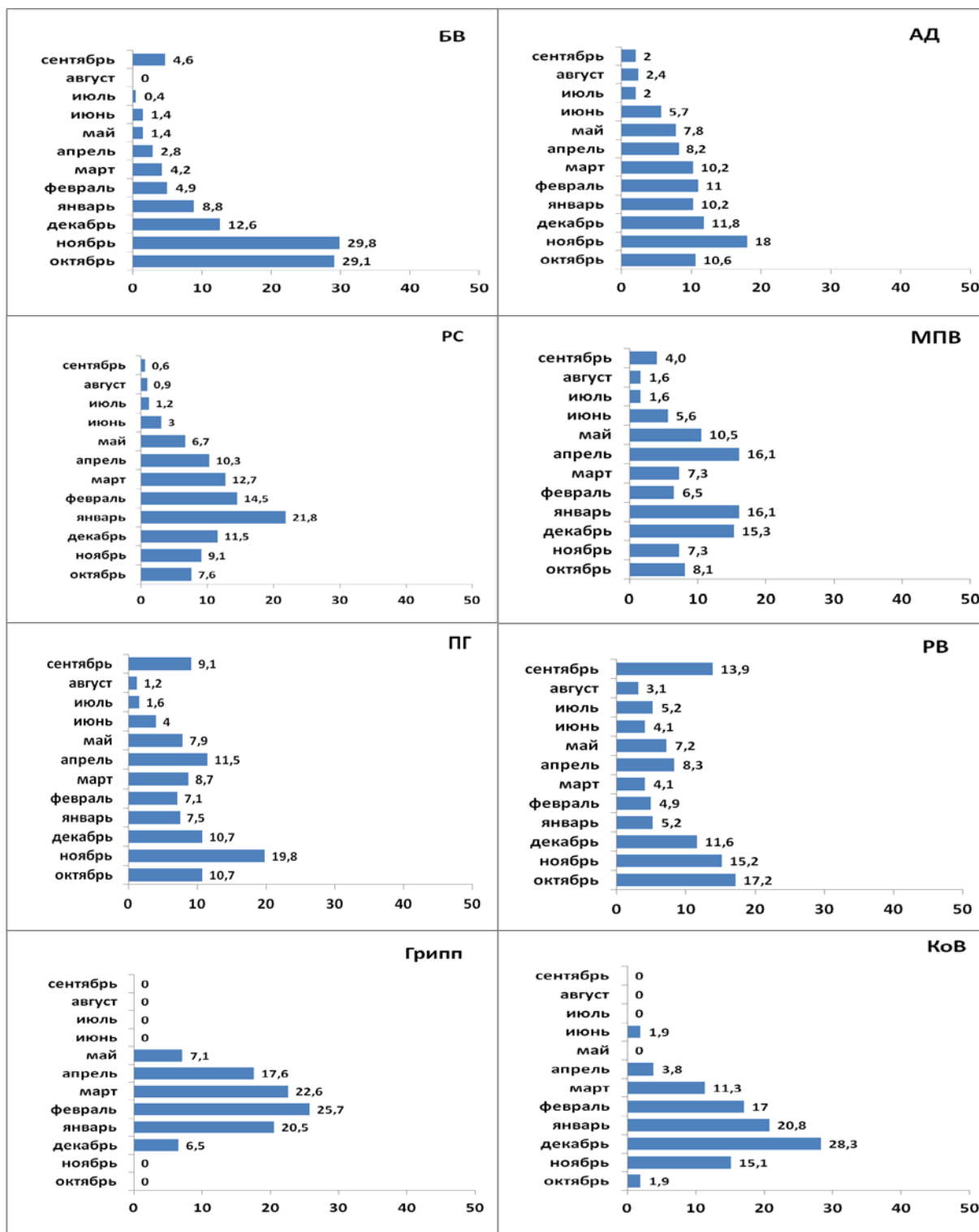


Рисунок 3. — Сезонная активность респираторных вирусов

Вирус гриппа выявлялся в клиническом материале пациентов полученных в декабре-марте каждого сезона, для аденовируса показан осенне-зимний период с пиком активности в ноябре месяце. Подъем заболеваемости в осенний период характерен для вирусов парагриппа, риновирусы активно выявлялись у госпитализированных детей на протяжении всего года.

Подъем заболеваемости НВoV инфекции отмечался с сентября по декабрь каждого года с пиком активности в ноябре месяце, снижением активности с января и окончание сезонного подъема в мае. Начало сезонного подъема для бокавирусной инфекции колебалось в относительно небольших пределах в разные сезоны, что позволяет предположить одинаковые для всех лет сроки активизации сезонных факторов.

Частота встречаемости респираторных вирусов в различных возрастных группах у госпитализированных детей значительно варьируется. Как видно из таблицы 1, достоверно чаще в возрастной категории от 0 до 1 года регистрировали РС — вирус (28,5 %) и риновирус (19,3 %), в возрастной категории от 1 года до трех лет такими возбудителями стали бокавирус (61,1 %) и вирусы парагриппа (45,6 %). Метопневмовирусы (37,4 %) и коронавирусы (32,1 %) наиболее часто выявлялись в возрастной категории от 3 до 7 лет, у детей старше 7 лет лидирующим этиологическим агентом стал вирус гриппа (47,1 %) ($p < 0,005$). Среди обследованных детей минимальный возраст пациентов позитивных для бокавируса составил 3 месяца, при этом у детей старше семи лет частота выявления вируса оказалась наиболее низкой. Снижение заболеваемости бокавирусной инфекции с увеличением возраста может быть обусловлено созреванием иммунной системы у детей.

Таблица 1. — Частота встречаемости респираторных вирусов у различных возрастных групп у госпитализированных детей

Респираторные вирусы	Частота встречаемости респираторных вирусов (%)			
	Возрастные категории			
	0–1 года	1–3 года	3–7 лет	старше 7 лет
БВ	16,5	61,1	18,9	3,5
АД	15,5	44,9	25,3	14,3
МПВ	0,8	44,4	37,4	8,1
РС-вирус	28,5	40,0	24,5	7,0
ПГ 1–4 типа	16,7	45,6	23,4	14,3
Риновирус	19,3	39,4	25,3	16,0
Грипп	9,0	19,3	24,5	47,1
КоВ	13,2	35,8	32,1	18,9
Всего:	16,9	39,1	24,7	19,3

Выводы. В заключение необходимо отметить, что в этиологической структуре ОРВИ среди госпитализированных детей преобладали риновирусы и вирусы гриппа. Наиболее высокий уровень бокавирусной инфекции зарегистрирован в сезон 2011–12 гг. и составил 19,4 %, самый низкий 6,6 % отмечен в 2013–14 гг. Бокавирус стал четвертым по частоте встречаемости среди респираторных вирусов. За анализируемый период прослеживается четкая тенденция циклического течения эпидемического процесса при бокавирусной инфекции с наличием периодов с высокими и низкими показателями заболеваемости. Подъем заболеваемости бокавирусной инфекции отмечался с сентября по декабрь каждого года с пиком активности в ноябре месяце, снижением активности с января и окончание сезонного подъема в мае. Бокавирус достоверно часто регистрировался в возрастной категории от 1 года до 3 лет,

в возрастной категории от 0 до 1 года наиболее часто выявлялись РС-вирус и риновирусы, у детей старше 7 лет — вирусы гриппа. Проведенные исследования показали, что бокавирус играет немаловажную роль в этиологии ОРВИ. Для понимания патогенеза, иммунных механизмов, длительности вирусной персистенции необходимо проведение дальнейших исследований.

Литература

1. Allander, T. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2005. — Vol. 102. — P. 12991–12896.
2. Schildgen, O. Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections? / O. Schildgen // *Clin. Microbiol.* — 2008. — Vol. 21, No. 2. — P. 291–304.
3. The family *Parvoviridae* / S. F. Cotmore [et al.] // *Arch. Virol.* — 2014. — Vol. 159, No. 5. — P. 1239–1247.
4. Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini / A. Kapoor [et al.] // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, No. 6. — e21362. — doi: 10.1371/journal.pone.0021362.
5. Detection of human bocavirus in respiratory, fecal, and blood samples by real-time PCR / S. J. Tozer [et al.] // *J. Med. Virol.* — 2009. — Vol. 81, No. 3. — P. 488–493.
6. Detection of human bocavirus from children and adults with acute respiratory tract illness in Guangzhou, southern China / W.-K. Liu1 [et al.] // *BMC Infect. Dis.* — 2011. — Vol. 11. — P. 345. — doi: 10.1186/1471-2334-11-345.
7. Case report: human bocavirus associated pneumonia as cause of acute injury, Cologne, Germany / M. Krakau [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. — 2015. — Vol. 94, No. 42. — e1587. — doi: 10.1097/MD.0000000000001587.
8. Prevalence of human bocavirus in human tonsils and adenoids / N. Clément [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 15. — P. 1149–1150.
9. Санитарные нормы и правила и гигиенические нормативы «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь»: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 12 окт. 2010 г. № 132.
10. Комплексная диагностика гриппа: инструкция по применению: утв. постановлением гл. гос. санитар. врача Респ. Беларусь 18 янв. 2011 г. № 121–1210.

BOCAVIRUS IN THE ETIOLOGICAL STRUCTURE OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

N.V. Sivets, N.P. Shmialiova, N.V. Gribkova, T.P. Lapo

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

In the paper we showed the etiological structure of acute respiratory viral infections (ARVI) over a seven-year study period. We also determined the contribution of bocavirus to the development of respiratory pathology in hospitalized children, studied the dynamics of the manifestation of the infectious process associated with human bocavirus. Diseases of bocavirus etiology were 11.8 % among children hospitalized in the hospital for ARVI. Bocavirus became the fourth most frequent respiratory virus in the etiologic structure of acute respiratory viral infection.

Keywords: human bocavirus, revealed frequency, acute respiratory infection.

Поступила 03.10.2017

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ СОДЕРЖАЩИХ ВОДУ ТЕХНОГЕННЫХ ОБЪЕКТОВ КАК ОСНОВА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СЛЕЖЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

**О.В. Тонко¹, Н.Д. Коломиец¹, О.Н. Ханенко¹, А.Г. Красько²,
Е.В. Федорович³, Ф.М. Фидаров³, С.А. Бусел³**

¹ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь;

³ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
Минск, Беларусь

Резюме. Проведенные исследования установили наличие возбудителя легионеллеза в водопроводной сети по всей республике, в том числе и наиболее патогенного варианта — *L. pneumophila* серогруппы 1. Выявление контаминации техногенных водоисточников, потенциально опасных в отношении распространения легионеллеза, показало необходимость предусмотреть при осуществлении производственного контроля организациями проведение микробиологических исследований на легионеллез с целью эпидемиологического слежения и профилактики заболевания у людей.

Ключевые слова: *Legionella pneumophila*, техногенные водоисточники, биопленки.

Введение. По современной классификации в соответствии с Определителем бактерий Берджи легионеллы относятся к семейству *Legionellaceae*, роду *Legionella*. В составе этого рода описано более 50 видов, из них 22 способны вызывать острое заболевание — легионеллез. Типовой и наиболее важный в патогенном отношении вид *Legionella pneumophila* (16 серогрупп). Чаще всего при вспышках от заболевших людей выделяют штаммы первой серогруппы. Около 80 % пневмоний легионеллезной природы обусловлено этим видом. Заболевания встречаются спорадически и в виде вспышек, иногда по несколько сотен заболевших и летальностью до 10 % [1].

Легионеллы — грамотрицательные бактерии с одним или двумя жгутиками, аэробы, капсул не образуют. Относительные термофилы. Для роста требуют специфических условий (наличие Л-цистеина, органического источника железа, низкой концентрации натрия). Осуществляют белковый тип питания, углеводы не усваивают, нитраты не редуцируют, уреазонегативны. Продуцируют каталазу. На обычных средах (кровяной агар, МПА, агар Хоттингера) не растут. Традиционная среда культивирования легионелл — угольно-дрожжевой агар (BCYE α), в состав которого входят дрожжевой экстракт, Л-цистеин, пиродифосфат железа, альфа-кетоглутаровая кислота, буфер ACES и активированный уголь. Оптимальная температура роста — 35°C. Первые колонии появляются через 3 сут инкубации. В стереомикроскопе они плосковыпуклые, диаметром 1–2 мм, гладкие, хорошо снимаются петлей, малахитово-зеленые, светло-голубые либо голубо-серые с мелкозернисто-мелковолокнистой структурой и извитым нисходящим радиальным узором. На 5-е сутки колонии такие же, но с более обозначенным серым центром, на 7-е сутки свечение ослабляется, мелковолоконность исчезает и остается гомогенная мелкозернистая структура серого цвета — «капля манной каши». Иногда вместо зеленого и голубого превалирует красное и фиолетовое свечение или появляется красноватое свечение периферии колонии при общем зеленовато-голубоватом цвете. В бульоне растут гомогенно, иногда появляется пленка, опускающаяся на дно. Легионеллы патогенны для морских свинок, песчанок, новорожденных крысят. ЛД50 при внутрибрюшинном заражении морских свинок — $1 \cdot 10^5$ м.к., при аэрозольном (интраназальном) — $1 \cdot 10^4$ м.к. [1, 2].

Заражение всегда связано с пресным водоисточником, чаще техногенным. Легионеллы — нормальные обитатели пресной воды. В природных водоемах (реки, озера, пруды) обычная концентрация легионелл летом составляет 1–10 м.кл./мл. В этих объектах их размножение сдерживается сапрофитической микрофлорой, однако в тех техногенных водоисточниках, где сопутствующая микрофлора подавлена, легионеллы способны размножиться до концентрации $1 \cdot 10^2$ – $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, создающей опасность заражения. Для иммуносупрессивных пациентов эта доза может быть значительно меньше, особенно если экспозиция была связана с *L. pneumophila серогруппы 1*, вызывающей нозокомиальную инфекцию. Такие ситуации могут возникнуть в водных системах охлаждения мощных кондиционеров (гостиницы, больницы, производства) или на других объектах, например, в системах горячего водоснабжения. Легионеллы активно размножаются в искусственных водных объектах, что приводит к возрастанию их концентрации еще и потому, что одной из особенностей экологии легионелл является способность образовывать биопленки. Биопленка представляет собой особую экологическую нишу, являющуюся чрезвычайно благоприятной средой для размножения микроорганизмов, так как формирующийся полисахаридный слой в совокупности с другими продуктами жизнедеятельности микроорганизмов образует матрикс биопленки, обеспечивающий бактериям защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды. Так, известно, что обычные способы дезинфекции воды в системах водоснабжения жилых домов, больниц и т. д. с помощью свободного хлора практически неэффективны против легионелл, находящихся в составе биопленок. Серьезной проблемой является формирование биопленок бактерий, в том числе легионелл, в резиновых и пластмассовых дренажных трубках, катетерах, других изделиях, применяемых в хирургии, а также в системах водоснабжения и водоотводов стоматологических установок. Среди компонентов естественных биопленок помимо легионелл были идентифицированы многочисленные виды рода *Pseudomonas*, прежде всего *P. aeruginosa*, а также *Actinomyces spp.*, *Aeromonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.* [3, 4]. Последние 20 лет исследования в области экологии легионелл и профилактики легионеллеза направлены на поиск и анализ условий и факторов, определяющих формирование биопленок легионелл, и, соответственно, на поиск и анализ факторов, способствующих деградации биопленки или предотвращающих ее формирование. Если ассоциация легионелл с амебами оказалась определяющей, прежде всего, для понимания патогенеза легионеллезной инфекции, и опосредованно влияет на тактику лечения (антибиотик должен обязательно проникнуть внутрь альвеолярного макрофага), то ассоциация легионелл с биопленками могла бы стать столь же значимой для выбора методов профилактики легионеллеза в потенциально опасных водных системах [5].

Цель работы — проведение микробиологического мониторинга контаминации легионеллами водных объектов и создание экспериментальных моделей моновидных биопленок легионелл.

Материалы и методы исследования. Объектами мониторинга окружающей среды явились пробы воды и смывов из инженерно-технических сооружений, связанных с циркуляцией воды.

Отбор проб воды осуществлялся в соответствии с требованиями СТБ ГОСТ Р 51592–2001 «Вода. Общие требования к отбору проб» и СТБ ГОСТ Р 51593–2001 «Вода питьевая. Отбор проб» и другими действующими ТНПА на методы отбора. Отбор проб прочих объектов внешней среды осуществляется в соответствии с инструкцией «Лабораторная диагностика легионеллеза. Методы обнаружения легионелл в объектах водной среды» № 011–1115, утв. МЗ РБ 08.12.2015 г.

Забор материала осуществляли стерильно, избегая соприкосновения пробки и края емкости с любыми поверхностями. После наполнения емкость закрывали

стерильной пробкой, обеспечивающей герметичность и не намокающей при транспортировании.

С учетом того, что в задачи этапа входило оценить способность выделенных легионелл и их микробов-ассоциантов к образованию биопленок на поверхности водопроводного оборудования, связанного с циркуляцией и хранением воды, соответствующие участки поверхностей исследовались на наличие не только легионелл, но и других микроорганизмов. Соскобы влажных биопленок с поверхности, находящейся под водой или на границе соприкосновения воды и воздуха, брали сухими тампонами и помещали во флакон или пробирку, содержащими стерильный физиологический раствор. Соскобы биопленок с высохшей поверхности брали тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором, и помещали в пробирку, содержащую стерильный физиологический раствор.

Подготовленный для исследования материал засеивали на питательные среды, предназначенные для культивирования легионелл, с обязательным добавлением ACES-буфера, L-цистеина и растворимого пирофосфата железа. С этой целью применяли питательную среду *Legionella* CYE Agar Base с ростовой и селективной добавкой производства, производство Liofilchem, Италия.

Использовали чашки с питательной средой без антибиотиков, а для ингибирования роста посторонней микрофлоры посевы осуществляли на питательные среды с добавлением смеси антибиотиков: полимиксин В 40 ЕД/мл + пенициллин 0,5 мкг/мл + амфотерицин В 80 мкг/мл. Посевы инкубировали во влажной атмосфере при температуре 35°C с созданием атмосферы 2,5–3 % CO₂. Рост колоний на питательных средах с добавлением смеси антибиотиков из посева первичного материала наблюдали на 4–5 суток. При подозрении на рост легионелл колонии пересевали на среду с ростовыми добавками и на контрольную среду без добавок, не поддерживающую рост легионелл. Рост во втором пассаже на специальной среде, при отсутствии роста на контрольной среде, позволял сделать предварительное заключение о наличии в образце *Legionella spp.* На селективных средах колонии легионелл, диаметром 1–2 мм, вырастали на 3–5-е сутки. Колонии выглядели плоско-выпуклыми с гранулярной или блестящей поверхностью серовато-голубоватого или зеленоватого цветов. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдали грамотрицательные палочки длиной 2–3 мкм.

Для идентификации легионелл и определения серогруппы применяли набор для латекс-агглютинации: NEW Legionel latex Test производства Oxoid, Великобритания, который позволял определять *Legionella pneumophila* серогруппы 1 и *Legionella pneumophila* серогрупп 2–14 [6].

Одновременно с выявлением легионелл после отбора смывов и проб водопроводной воды, проводился их посев на следующие питательные среды: МПА — для оценки общего уровня контаминации исследуемых объектов, Сабуро (HiMedia) — для выявления плесневых грибов и дрожжей, Эндо — для определения наличия в смывах бактерий группы кишечной палочки (БГКП), неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ), желточно-солевой агар (ЖСА), Байрд-Паркер — для выявления и первичной идентификации стафилококков.

Глубинным методом проводили посев на агар Сабуро. Чашки инкубировали при температуре 24±1°C в течение 120 часов. При посеве на Байрд-Паркер и Эндо втирали посевной материал тампоном непосредственно в питательный агар. Посевы инкубировали при температуре 37±1°C в течение 24±2 часов. Выросшие типичные колонии пересевали на чашки Петри с недифференцированным агаром МПА и инкубировали при температуре 37±1°C в течение 24±2 часов. После окраски по Граму бактерии идентифицировали с использованием биохимического микробиологического

анализатора VITEK (Biomerieux). Выборочно идентифицировали и колонии, выросшие на агаре МПА.

Полученные цифровые данные обработаны с использованием методов статистики, адекватных поставленным задачам и объемам.

Результаты исследования и обсуждение. О проблемах, связанных с диагностикой, лечением и профилактикой легионеллезной инфекции известно давно, однако в Республике Беларусь активные исследования до 2014 г. не проводились.

За 2014 г. — первый квартал 2017 г. было исследовано 1900 смывов с поверхностей, более 1000 проб воды из объектов организаций здравоохранения, санаториев, бань, спортивных сооружений, гостиниц, жилых зданий и др. В результате проведенных исследований было выделено и идентифицировано 281 изолят микроорганизмов, относящихся к роду *Legionella*, из которых 236 изолятов идентифицированы как *Legionella pneumophila* серогруппы 2–14, к *Legionella pneumophila* серогруппы 1 отнесено 42 изолята, 3 изолята — *Legionella spp.*

Положительные находки были выявлены в пробах воды и смывах с объектов окружающей среды из организаций здравоохранения, гостиниц, санаториев, спортивных сооружений, жилых комплексов и предприятий. Частота положительных проб колебалась в пределах от 3,2 % в Минской области до 14,8 % в г. Минске. В среднем, частота контаминации исследованных проб легионеллами составила 3,4 % в Гомельской области, 4,2 % — в Могилевской, 4,6 % — в Брестской, 5,8 % — в Витебской и 7,2 % — в Гродненской областях. При этом, частота положительных находок в смывах с объектов внешней среды составила 1,6 %, а из воды — 13,0 %. Установлено, что при отсутствии выделения *Legionella pneumophila* из воды централизованного водоснабжения бактерии можно было обнаружить в смывах с объектов внешней среды. *Legionella pneumophila* серогрупп 2–14 выделена из горячей и холодной воды, в смывах с головок душа, водопроводных кранов, кондиционеров, ванн, а также медицинского оборудования в организациях здравоохранения, санаториях, спортивных сооружениях, гостиницах, жилых зданиях и предприятиях. *Legionella pneumophila* серогруппы 1 выделена в смывах с головок душа, водопроводных кранов и из горячей воды в организациях здравоохранения, жилком здании, со стен бассейна жилого здания, воды бассейна организации здравоохранения и горячей и холодной воды гостиниц. Концентрация легионелл в положительных образцах находилась в от $1,0 \times 10^2$ до $5,0 \times 10^4$ м.к./л.

При исследовании проб объектов окружающей среды больничных организаций здравоохранения легионеллы были обнаружены в 15,7 % исследованных нами образцов. Легионеллы выделяли из горячей и холодной воды, воды приточно-вытяжных теплообменников, бойлеров, смывов с сеточек душа, водопроводных кранов. В основном наблюдалась низкоуровневая контаминация — от $2,0 \times 10^2$ до $6,0 \times 10^3$ КОЕ/л, однако в нескольких пробах она достигла концентрации способной вызвать инфицирование — $5,0 \times 10^4$ КОЕ/л.

Проведено изучение микробиоты в 20 пробах водопроводной воды и 10 смывах из инженерно-технических сооружений, где нами были найдены положительные находки *Legionella pneumophila*. К микробам-ассоциантам легионелл отнесены условно-патогенные микроорганизмы (УПМ), относящиеся к видам *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*. У всех выделенных штаммов УПМ в ходе идентификации изучены биологические свойства: морфологические особенности, способность к движению, отношение к кислороду, ростовые характеристики и морфология колоний, оптимальные условия культивирования,

продукция пигментов, ферментов, гемолиз, биохимическая характеристика. Некоторые изоляты исследовались на устойчивость к антибактериальным препаратам.

Для выявления и количественной оценки способности к образованию биопленок легионелл и их микробов-ассоциантов, использовались методы, основанные на детекции сформированного вокруг микробных клеток межклеточного экзополисахаридного матрикса биопленки. Использование данных методов позволило сравнить полученные нами практические результаты исследований с литературными данными.

Были оптимизированы условия культивирования легионелл и разработана методика получения моновидных биопленок легионелл.

Определение способности бактерий к пленкообразованию предполагает проведение нескольких этапов, обязательность которых зависит от целей исследования. При выявлении одного штамма бактерий, относящегося к патогенным или условно-патогенным микроорганизмам, рекомендуется оценка способности данного штамма к формированию биопленок с использованием планшетного метода.

При обнаружении нескольких штаммов патогенной или условно-патогенной микрофлоры в одной пробе, рекомендуется проводить оценку взаимного влияния микробов-ассоциантов. Способность к пленкообразованию в таком случае определяется у основных исследуемых штаммов и штаммов-ассоциантов. Также при обнаружении нескольких штаммов в одной пробе рекомендуется изучить способность бактерий к образованию смешанных биопленок.

Оценка способности легионелл к пленкообразованию с использованием планшетного метода минимизирует получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов при высокой чувствительности, специфичности и точности. Сущность метода заключается в посеве изучаемых штаммов легионелл в жидкую питательную среду в ячейки 96-луночного полистиролового планшета. После инкубации проводится окраска бактериальной пленки и оценка интенсивности окрашивания с использованием спектрофотометра или иммуноферментного анализатора.

Выращенные в бульоне 72-часовые культуры тестируемых штаммов легионелл (суспензии микроорганизмов с оптической плотностью 0,5 единиц МакФарланда) разводятся свежей питательной средой (триптон-соевый бульон с глюкозой) 1:10. Параллельно 1 мл 72-часовых культур тестируемых штаммов легионелл засевают в 5 мл воды. Полученные бульонные суспензии культур стерильно вносят по 150 мкл в ячейки 96-луночного полистиролового планшета (по 4 лунки для каждого штамма). Для контроля фона также в 4 лунки необходимо внести питательную среду, в которой инкубировали культуры. Параллельно водные суспензии культур вносят по 150 мкл в ячейки 96-луночного полистиролового планшета (по 4 лунки для каждого штамма). Для контроля фона также в 4 лунки необходимо внести воду. Планшет с питательной средой инкубируется при температуре $28\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 96 ± 2 час, планшет с водой инкубируется при температуре $28\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 2-х недель.

По окончании инкубации оптическую плотность выросших планктонных клеток определяют с использованием спектрофотометра (длина волны 540 нм) или иммуноферментного анализатора. Затем содержимое ячеек осторожно аспирируется. После необходимо внести по 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1 % спиртового раствора кристалл виолета. Планшет инкубируется при температуре $20\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 45 мин. Затем краситель удаляется, лунки промываются дважды дистиллированной водой. Вносят по 200 мкл 96 % этилового спирта и оставляют на 45 мин при температуре $20\pm 1^\circ\text{C}$.

Интенсивность окрашивания спирта в лунках планшеты определяют с использованием спектрофотометра (длина волны 540 нм) или иммуноферментного анализатора.

Для оценки способности бактерий к образованию биопленок необходимо вычислить среднее значение оптической плотности 6 ячеек отрицательного контроля (ОП_{ОК}). Для каждого штамма также определяется среднее значение оптической плотности по 4 ячейкам (ОП_{штамма}). Минимальное значение оптической плотности для ячеек с микроорганизмами, способными к образованию биопленки (ОП_{min}) является сумма среднего значения оптической плотности ячеек отрицательного контроля и 3 стандартных отклонений среднего значения оптической плотности ячеек отрицательного контроля:

$$ОП_{min} = ОП_{ОК} + 3 * \text{стандартное отклонение } ОП_{ОК}$$

Интерпретация результатов исследований проводится в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. — Степень способности к образованию биопленок исследуемых штаммов микроорганизмов

Среднее значение ОП _{штамма}	Способность к пленкообразованию
$\leq 2 \times ОП_{min}$	Отсутствует/ слабо выражена
$2 \times ОП_{min} — 4 \times ОП_{min}$	Умеренная
$> 4 \times ОП_{min}$	Сильная

Нами проведена оценка выделенных штаммов условно-патогенных бактерий, относящихся к видам *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* на наличие и степень проявления способности к пленкообразованию планшетным методом. Изучение способности к пленкообразованию проведено у 18 штаммов. Исследования проводили в четырех повторностях для каждого штамма (таблица 2).

Таблица 2. — Пленкообразующая способность штаммов, выделенных из водных объектов

Вид микроорганизмов	Число штаммов×число повторностей	Оптическая плотность, $M \pm m$	Оценка пленкообразования по критерию Stepanovic
контроль	12	0,088±0,011	—
<i>Escherichia coli</i>	16	0,718± 0,106	Сильная
<i>P. aeruginosa</i>	8	1,553± 0,152	Сильная
<i>B. subtilis</i>	8	0,709±0,137	Сильная
<i>E. faecalis</i>	8	1,018±0, 29	Сильная
<i>S. saprophyticus</i>	8	0,723±0,084	Сильная
<i>S. epidermidis</i>	8	0,592±0,2	Сильная
<i>S. aureus</i>	8	0,245±0,03	Умеренная

Полученные результаты показали, что все штаммы обладают способностью к пленкообразованию, при этом наиболее выраженную способность к образованию биопленок, которую можно отнести к сильной по критерию Stepanovic), имеют штаммы *E. coli*, *E. faecalis*, *St. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*.

Отдельно в соответствии с разработанной нами методикой проведена оценка выделенных штаммов *Legionella pneumophila* на способность к образованию биопленок. Изучение способности к пленкообразованию проведено у 3-х штаммов. Исследования проводили в 8-ми повторностях для каждого штамма (таблица 3).

Таблица 3. — Пленкообразующая способность штаммов *Legionella pneumophila*

Вид микроорганизмов	Число штаммов×число повторностей	Оптическая плотность, М±m	Оценка пленкообразования по критерию Stepanovic
контроль	8	0,085±0,011	—
<i>Legionella pneumophila</i>	24	2,895±0,49	Сильная

Установлено, что все протестированные штаммы *L. pneumophila*, выделенные из водных объектов, обладают сильной способностью к пленкообразованию.

Выводы.

1. В результате исследований показано, что в зданиях общественного назначения имеется контаминация систем водоснабжения *L. pneumophila*. Уровни концентрации *L. pneumophila* составили от $1,0 \times 10^2$ до $5,0 \times 10^4$ м.к./л., что свидетельствуют о недостаточности или неэффективности профилактических мероприятий.

2. Установлена высокая степень эпидемиологического риска легионеллеза, связанная с наличием в воде искусственных водных систем наиболее опасного в эпидемиологическом отношении штамма *L. pneumophila* серогруппы 1.

3. Разработана методика образования моновидных биопленок легионеллами, где оптимизированы условия роста бактерий.

4. Обнаружение легионелл в водных объектах окружающей среды, установление факта, что изолированные штаммы *L. pneumophila* обладают сильной способностью к пленкообразованию являются основанием для проведения планомерного, системного микробиологического мониторинга и организации эффективного эпидемиологического слежения за легионеллезом в Республике Беларусь.

Литература

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство /Под ред. академика РАМН Г. Г. Онищенко, академика РАМН В. В. Кутырева.— Изд. 2-е, переработанное и дополненное. — М.: ЗАО «Шико», 2013. — 560 с.

2. Атлас возбудителей особо опасных бактериальных инфекционных болезней / Под ред. акад. РАН В.В. Кутырева. — Саратов : Амирит, 2015. — 168 с.

3. Профилактика, диагностика и лечение легионеллеза / И.С. Тартаковский [и др.]. — М.: Студия МДВ, 2013. — 344 с.

4. Molecular Detection of *Legionella* spp. and the associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system / J. Lu, I. Struewing, E. Vereen, A.E. Kirby, K. Levy, C. Moe and N. Ashbolt // *Journal of Applied Microbiology*. — 2015, Vol.120 — P. 509—521.

5. Карпова, Т.И. Формирование биопленок *Legionella* spp. в эксперименте / Т.И. Карпова, Ю.Е. Дронина, Н.В. Алексеева и др. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2008. — № 1 — С. 1—7.

6. Лабораторная диагностика легионеллеза. Методы обнаружения легионелл в объектах водной среды: инстр-я по прим. № 011–1115 / А.Г. Красько, О.В. Тонко, Н.Д. Коломиец, Е.А.Сержант, О.Н.Ханенко, О.Н. Романова, Л.М. Рустамова, Н.Н. Левшина, Е.В. Федарович, Ф.М. Фидаров, Я.В. Молочкова — Минск: 2015 — 19 с.

MICROBIOLOGICAL MONITORING OF TECHNOGENIC OBJECTS CONTAINING WATER AS A BASIS OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE AND PREVENTION OF LEGIONELLOSIS

*O.V. Tonko¹, N.D. Kolomiets¹, O.N. Hanenko¹, A.G. Kras'ko², E.V. Fedorovich³,
F.M. Fidarov³, S.A. Busel³*

*State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education",
State Institution "Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology"
State Institution "Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health"
Minsk, Belarus*

The conducted studies established the presence of legionellosis pathogen in the water supply network throughout the country, including the most pathogenic variant — *L. pneumophila* serogroup 1. Detection of contamination of technogenic water sources, potentially dangerous with respect to the spread of legionellosis, showed the need to provide in organizations conducting microbiological studies on legionellosis when carrying out production control for the purpose of epidemiological surveillance and prevention of the disease.

Keywords: *Legionella pneumophila*, technogenic water sources, biofilms.

Поступила 28.09.2017

БЕШЕНСТВО В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ. ФАКТОРЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

О.Н. Ханенко, Н.Д. Коломиец, О.В. Тонко

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

Резюме. Проведен анализ обращаемости населения Республики Беларусь за антирабической медицинской помощью в динамике с 2013 по 2016 гг., в том числе в разрезе областей и города Минска. Отдельно анализировались категория повреждения у лиц, обратившихся за антирабической медицинской помощью, а также частота обращения за антирабической помощью в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством. Определена ведущая роль домашних животных с установленным бешенством в качестве основной причины обращения за антирабической медицинской помощью населения страны в анализируемый период наблюдения.

Ключевые слова: бешенство, современные эпидемиологические особенности, факторы эпидемиологического риска.

Введение. Как известно, эпидемиологический риск — это возможность (вероятность) осложнения эпидемиологической ситуации в определенное время (время риска), на определенной территории (территория риска) и среди определенной группы населения (группа риска) в связи с неблагоприятным воздействием определенных факторов риска. При этом факторами эпидемиологического риска (предпосылками осложнения эпидемиологической ситуации) могут быть биологические, природные и социальные «пусковые» факторы с учетом особенностей эпидемиологической характеристики инфекционного заболевания [1].

В Республике Беларусь последний случай заболевания и смерти человека от бешенства был зарегистрирован в 2012 г. [2]. При этом, несмотря на все достижения в области контроля и профилактики инфекции на территории страны, дальнейшее обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия по бешенству невозможно без установления факторов эпидемиологического риска, появление или активизация которых способны обусловить возникновение эпидемического процесса.

Цель работы: установить эпидемиологические особенности рабической инфекции в Республике Беларусь на современном этапе в отсутствие случаев заболевания бешенством среди населения для совершенствования эпидемиологического слежения и профилактики.

Материалы и методы. Основу методологии составил ретроспективный эпидемиологический анализ обращаемости за антирабической медицинской помощью (АРМП) населения Республики Беларусь за период с 2013 по 2016 гг. Изучение современных эпидемиологических особенностей рабической инфекции осуществлялось на основании сведений, включенных в ежегодные бюллетени ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь [3–6]. Для расчета показателей частоты обращения населения за АРМП использованы данные о среднегодовой численности населения Республики Беларусь, в том числе в разрезе областей и г. Минска, представленные Национальным статистическим комитетом Республики Беларусь.

В динамике за ряд лет указанного периода проанализированы общереспубликанские, а также в разрезе областей и города Минска показатели частоты обращения населения за АРМП, а также обращаемость за АРМП лиц, получивших повреждения, нанесенные животными с установленным бешенством. Дополнительно проведена оценка особенностей контакта с животным и данных о животном, нанесшим повреждения. Отдельно анализировались категория повреждений у лиц, обратившихся за АРМП.

Полученные цифровые данные обработаны с использованием методов статистики, адекватных поставленным задачам и объемам выборочных совокупностей. Для оценки частоты и структуры изучаемых явлений рассчитывали относительные показатели (p) со статистическими ошибками (Sp) и 95 % доверительными интервалами (ДИ). Различия между сравниваемыми относительными величинами определяли по значению t -критерия Стьюдента и уровню значимости (P), сравнивая его с критической величиной для соответствующего объема выборки, а также по значениям 95 % ДИ.

Результаты и их обсуждение. За период с 2013 по 2016 гг., в отсутствие случаев заболевания бешенством людей, за оказанием АРМП в организации здравоохранения Республики Беларусь обратились 82 885 человек. На протяжении всего четырехлетнего периода наблюдения частота обращения населения страны за АРМП, оставаясь стабильно высокой, не претерпевала существенных изменений, составив $218,4^{0/0000}$ (95 %ДИ 215,4–221,4) — в 2013 г., $209,6^{0/0000}$ (95 %ДИ 206,6–212,6) — в 2014 г.; $224,9^{0/0000}$ (95 %ДИ 221,9–227,9) — в 2015 г. и $221,1^{0/0000}$ (95 %ДИ 218,1–224,1) — в 2016 г. При этом частота обращения за АРМП на отдельных административных территориях республики была неодинаковой (рисунок 1).

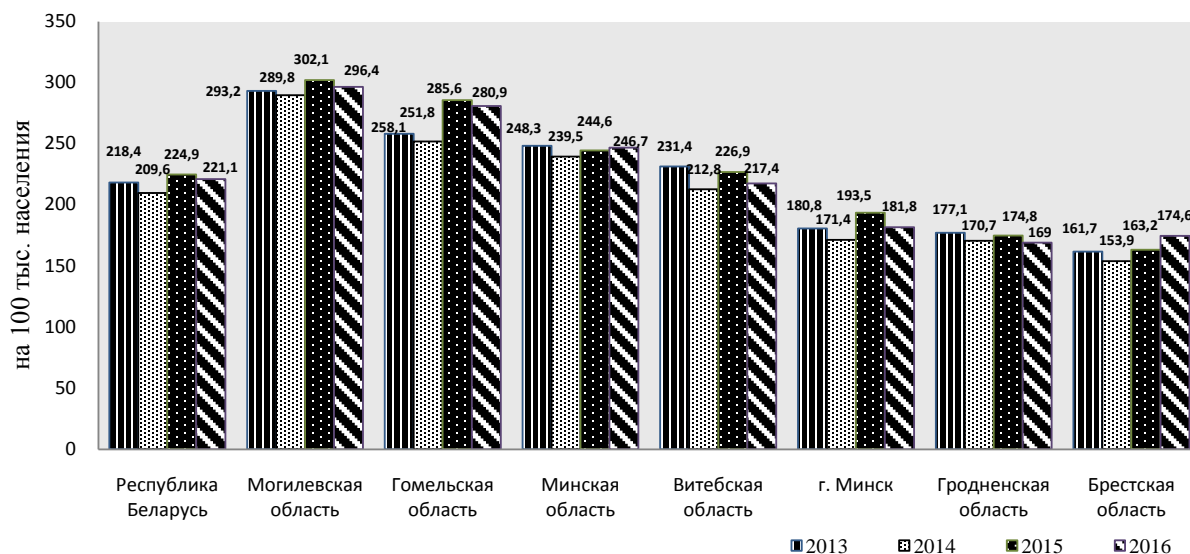


Рисунок 1. — Обращаемость за антирабической медицинской помощью населения Республики Беларусь, населения областей и г. Минска, в 2013–2016 гг.

Установлено, что в Могилевской, Гомельской и Минской областях показатели обращаемости населения за АРМП были выше за все годы наблюдения в сравнении с республиканскими показателями. Так, частота обращения за АРМП населения Могилевской области за ряд лет наблюдения была наибольшей, превышая республиканский показатель в 1,4 раза в 2014 г. ($P < 0,001$) и в 1,3 раза — в 2013, 2015, 2016 гг. ($P < 0,001$). В тоже время, если на территории Минской области достоверное превышение республиканского показателя обращаемости за АРМП в 1,1 раза было отмечено на протяжении всех лет наблюдения, как в период с 2013–2015 гг. ($P < 0,001$), так и в 2016 г. ($P < 0,01$), то на территории Гомельской области — в 1,2 раза в 2013 г. ($P < 0,001$) и 2014 г. ($P < 0,01$), в 1,3 раза — в 2015 г. ($P < 0,001$) и 2016 г. ($P < 0,05$). В Витебской области частота обращения за АРМП была выше в 1,1 раза по сравнению с аналогичным показателем по стране только в 2013 г. ($P < 0,01$), а в дальнейшем на протяжении трех лет с 2014 по 2016 гг. оставалась практически одинаковой по отношению к республиканским показателям ($P > 0,05$). Достоверно реже обращались за оказанием медицинской помощи пострадавшие от нанесенных животными повреждений граждане на территории Брестской и Гродненской областей, а также города Минска. Обращаемость за АРМП населения Брестской области была ниже в 1,4 раза в 2013–2015 гг. ($P < 0,001$) и в 1,3 раза — в 2016 г. ($P < 0,05$) в сравнении с аналогичными показателями по республике. Частота обращения населения за АРМП в Гродненской области оказалась меньше в сравнении с показателями по стране в 1,2 раза в 2013 г. ($P < 0,01$) и 2014 г. ($P < 0,001$), в 1,3 раза — в 2015 и 2016 гг. ($P < 0,05$). В г. Минске обращаемость за АРМП за все годы наблюдения была стабильно ниже общереспубликанских значений в 1,2 раза ($P < 0,05$).

Как известно, реализацию риска инфицирования при бешенстве предопределяет категория повреждения, устанавливаемая в момент обращения пациента за АРМП в зависимости от характера контакта и данных о животном. Так при 1-й категории повреждения риск инфицирования человека вирусом бешенства отсутствует, поэтому антирабическое лечение не назначается. При 2-й категории повреждения вероятность реализации риска по передаче возбудителя требует немедленного начала лечения с применением схемы лечебно-профилактических прививок. Выраженный риск

инфицирования вирусом бешенства при 3-й категории повреждения устанавливает необходимость начать немедленно комбинированное лечение антирабическим иммуноглобулином и антирабической вакциной [7, 8].

Проведенный анализ частоты обращения населения Республики Беларусь за АРМП с разными категориями повреждений в 2013–2016 гг. демонстрирует ежегодное увеличение регистрации 3-й категории повреждения с превышением в 2016 г. анализируемого показателя в 2,8 раза в сравнении с 2013 г. ($P < 0,02$), в 1,7 раза в сравнении с 2014 г. ($P < 0,001$) и в 1,1 раза в сравнении с 2015 г. ($P < 0,01$). При этом за все годы наблюдения показатель обращаемости с данной категорией повреждения оставался наименьшим по стране (таблица 1).

Таблица 1. — Частота обращения за АРМП населения в Республике Беларусь с разными категориями повреждений в 2013–2016 гг.

Категория повреждения	Количество обращений за АРМП							
	2013:		2014:		2015:		2016:	
	абс. число	на 1000 обращений в год (95 % ДИ)	абс. число	на 1000 обращений в год (95 % ДИ)	абс. число	на 1000 обращений в год (95 % ДИ)	абс. число	на 1000 обращений в год (95 % ДИ)
1	8771	424,3 (417,5–431,1)	6400	322,3 (315,7–328,9)	5769	270,4 (264,6–276,4)	5372	255,7 (250,1–261,3)
2	10166	491,8 (484,8–498,8)	10716	539,6 (532,6–546,6)	11163	523,2 (516,4–530,0)	10792	513,5 (506,7–520,3)
3	1736	84,0 (80,2–87,8)	2743	138,1 (133,3–142,9)	4406	206,5 (200,9–212,1)	4851	230,8 (225,0–236,6)

В сравнении с другими категориями повреждений частота обращения населения за АРМП со 2-й категорией, была наибольшей на протяжении всего периода наблюдения, при этом анализируемый показатель сначала незначительно увеличился в 1,1 раза в 2014 г. по сравнению с 2013 г. ($P < 0,001$), а затем в 2016 г. снизился в сравнении с 2014 г. в 1,1 раза ($P < 0,001$). В тоже время, показатель обращаемости с 1-й категорией повреждения, ежегодно находясь на уровне промежуточных значений показателя между 2-й и 3-й категориями, снижался в течение всего периода наблюдения, и в 2016 г. в сравнении с показателями 2013, 2014 и 2015 гг. стал ниже в 1,7 раза ($P < 0,02$), в 1,3 раза ($P < 0,001$) и в 1,1 раза ($P < 0,02$) раза соответственно.

Из числа 82 885 человек, обратившихся в течение четырех лет за оказанием АРМП в организации здравоохранения страны, у 2 247 или 2,7 % (95 % ДИ 2,5–2,9) пациентов повреждения были нанесены животным с установленным бешенством. При этом ежегодная частота обращения населения Республики Беларусь за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством, не была стабильной и составила: в 2013 г. — 5,7⁰/₀₀₀₀ (95 % ДИ 5,3–6,1); в 2014 г. — 4,4⁰/₀₀₀₀ (95 % ДИ 4,8–4,0), что в 1,3 раза ниже значения предыдущего года ($P < 0,001$); в 2015 г. — 7,1⁰/₀₀₀₀ (95 % ДИ 6,5–6,7), превышая значение 2013 г. в 1,3 раза ($P < 0,001$) и показатель 2014 г. в 1,6 раз ($P < 0,001$); в 2016 г. — 6,6⁰/₀₀₀₀ (95 % ДИ 6,0–7,2), т.е. достоверно не изменилась по отношению к предшествующему году ($P > 0,05$) и была в выше значений 2013 и 2014 гг. в 1,2 раза ($P < 0,02$) и 1,5 раза ($P < 0,001$) соответственно (рисунок 2).

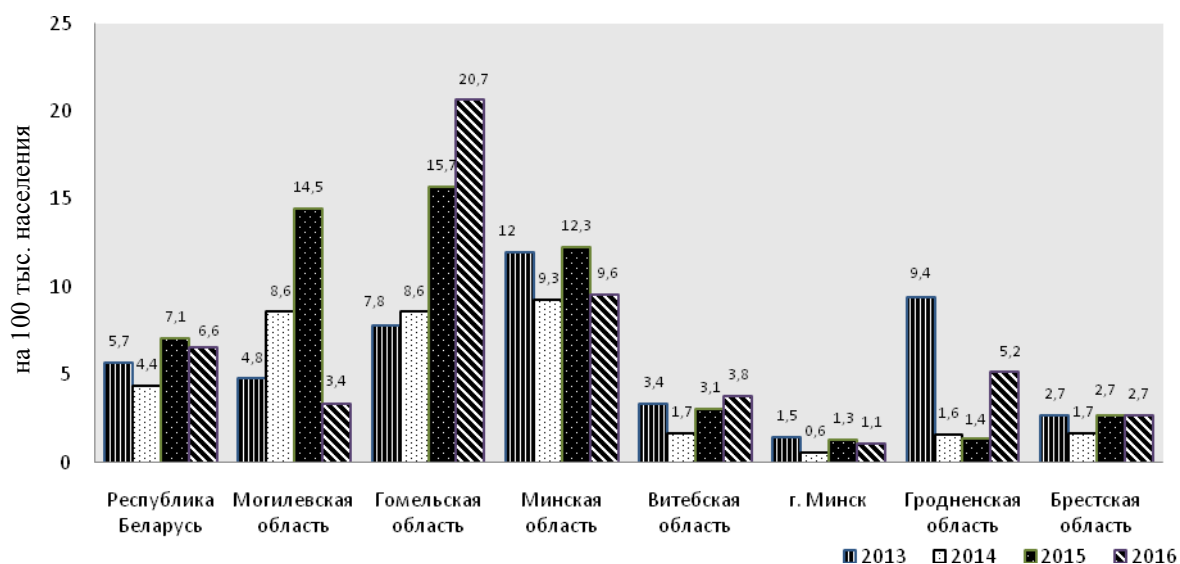


Рисунок 2. — Обращаемость за антирабической медицинской помощью в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством, населения Республики Беларусь, населения областей и г. Минска, в 2013–2016 гг.

На территории Могилевской области анализируемый показатель обращаемости за АРМП, постепенно нарастая с 2013 по 2015 гг. с $4,8^{0/0000}$ (95 %ДИ 3,4–6,2) до $14,5^{0/0000}$ (95 %ДИ 12,1–16,9), резко снизилась до уровня $3,4^{0/0000}$ (95 %ДИ 2,2–4,6) в 2016 г., т.е. в 4,3 раза в сравнении с показателем предыдущего года наблюдения ($P < 0,001$). Необходимо отметить, что обращаемость населения за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными больными бешенством животными, на территории Минской области в 2016 г. также снизилась в 1,3 раза по отношению к областному показателю за предшествующий 2015 г. ($P < 0,05$). При этом в течение всего периода наблюдения анализируемый показатель в данном регионе оставаясь одним из высоких по стране, находился на одинаковом уровне в 2013 и 2015 гг. — $12,0^{0/0000}$ (95 %ДИ 10,2–13,8) и $12,3^{0/0000}$ (95 %ДИ 10,5–14,1) соответственно ($P > 0,05$); в 2014 и 2016 гг. — $9,3^{0/0000}$ (95 %ДИ 7,7–10,9) и $9,6^{0/0000}$ (95 %ДИ 8,0–11,2) соответственно ($P > 0,05$). На территории Гомельской области в течение всех лет наблюдения частота обращения лиц за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством нарастала, достигнув наибольшего значения по стране в 2016 г. — $20,7^{0/0000}$ (95 % ДИ 18,3–23,1), при этом аналогичный годовой республиканский показатель был превышен в 3,3 раза ($P < 0,01$), а показатель по области в сравнении с 2013, 2014 и 2015 гг. — в 2,7 раза ($P < 0,001$), в 2,4 раза ($P < 0,001$) и в 1,3 раза ($P < 0,02$) соответственно. На территории Гродненской области в 2016г. анализируемый показатель обращаемости не отличался от республиканского ($P > 0,05$), однако по отношению к областным значениям 2014 и 2015 гг. увеличился в 3,3 раза и 3,7 раза соответственно ($P < 0,001$).

Наименьшая частота обращения населения за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством, на протяжении всех лет наблюдения отмечалась на территории г. Минска, а также в Брестской и Витебской области. Так в г. Минске в 2014 г. значение данного показателя составило $0,6^{0/0000}$ (95 %ДИ 0,2–1,0), т.е. было минимальным по стране за все годы наблюдения. В 2013, 2015 и 2016 гг. анализируемый показатель обращаемости в столице также сохранял наименьшие годовые значения по республике и находился на уровне $1,5^{0/0000}$ (95 %ДИ 0,9–2,1), $1,3^{0/0000}$ (95 %ДИ 0,7–1,9) и $1,1^{0/0000}$ (95 %ДИ 0,7–1,3) соответственно. На территории Брестской области в течение всего периода наблюдения частота

обращения населения за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством, сохранялась на стабильно низком уровне 1,7–2,7 на 100 тысяч населения и не претерпевала существенных изменений ($P > 0,05$). На территории Витебской области анализируемый показатель обращаемости населения за АРМП был наименьшим в 2014 г. — 1,7⁰/₀₀₀₀ (95 %ДИ 0,9–2,5), т.е. ниже областного показателя 2013 г. в 2 раза ($P < 0,02$), 2015 г. — в 1,8 раза ($P < 0,05$) и 2016 г. — в 2,2 раза ($P < 0,02$).

Результатами предыдущих исследований изучения эпидемиологических особенностей 144 случаев бешенства, зарегистрированных в Республике Беларусь с 1951 по 2012 гг., установлено, что в разрезе отдельных областей республики лидирующее положение по числу заболевших бешенством заняла Гомельская область (38 человек или 26,4 %; 95 %ДИ 19,0–33,8). На жителей Могилевской области, вовлеченных в эпидемический процесс, пришлось 25 заболевших (17,4 %; 95 %ДИ 11,0–23,8); Гродненской — 23 (16,0 %; 95 %ДИ 9,8–22,2); Витебской — 22 (15,3 %; 95 %ДИ 9,3–21,3) и Минской — 20 (13,9 %; 95 %ДИ 8,1–19,7). Наименьшее число случаев заболеваний бешенством зарегистрировано в Брестской области — 16 (11,1 %; 95 %ДИ 5,9–16,3), причем последний эпизод зафиксирован только в 1962 г., тогда как в Минской и Витебской областях — в 2006 г., в Гродненской — в 2009 г., в Гомельской — в 2011 г. и Могилевской — в 2012 г. Вместе с тем, из 144 лиц, заболевших бешенством, 105 (72,9 %; 95 %ДИ 65,5–80,3) человек не обращались в организации здравоохранения за медицинской помощью, в связи с чем им не была проведена постконтактная лечебно-профилактическая антирабическая иммунизация [2].

Так как эпидемиология бешенства неразрывно связана с особенностями эпизоотического процесса, эколого-биологические особенности животных разных видов обуславливают их значимость в эпидемиологии рабической инфекции, определяя степень их опасности в качестве источников инфекции для человека [1, 8].

Из 144 случаев бешенства, зарегистрированных в Республике Беларусь с 1951 по 2012 гг., только приблизительно треть заболевших — 43 человека (29,9 %; 95 %ДИ 22,3–37,5) получили травмы от диких животных больных бешенством, тогда как наибольшее количество заболевших — 96 человек или 66,7 % (95 %ДИ 58,9–74,5) пострадали в результате контакта с домашними животными. В 5 (3,5 %; 95 %ДИ 0,5–6,5) случаях источник инфекции точно не был установлен. Среди домашних животных основными источниками бешенства для человека явились собаки. Так из 96 лиц, заболевших бешенством в результате повреждений, нанесенных домашними животными, 87 человек или 90,6 % (95 %ДИ 84,6–96,6) пострадали от укусов собак, и только 9 пациентов или 9,4 % (95 %ДИ 3,4–15,4) — от травм, полученных при контакте с кошками. Из 43 случаев рабической инфекции, связанных с дикими животными, наибольшее количество случаев (28 человек или 65,1 %; 95 %ДИ 50,5–79,7) возникло в результате повреждений, нанесенных лисами, реже — волками (11 человек или 25,6 %; 95 %ДИ 12,2–39,0). В результате травм, нанесенных енотовидными собаками, заболели 4 пациента (9,3 %; 95 %ДИ 0,5–28,1) из 43 [2].

Из 2242 животных с установленным бешенством и нанесших повреждения одному или нескольким лицам, обратившимся за АРМП в период с 2013 по 2016 гг. в организации здравоохранения страны, домашние животные (собаки и кошки) составили 1169 особей или 52,2 % (95 %ДИ 52,0–54,4), сельскохозяйственные животные — 597 или 26,6 % (95 %ДИ 24,8–28,4), дикие животные — 476 или 21,2 % (95 %ДИ 19,4–23,0). Установлено, что из числа 1169 домашних животных с установленным бешенством, на безнадзорных кошек пришлось только 63 или 5,4 % (95 %ДИ 4,0–6,8), а безнадзорных собак — 111 или 9,5 % (95 %ДИ 7,7–11,3). При этом количество больных бешенством домашних собак и кошек, нанесших повреждения обратившимся за АРМП лицам, было наибольшим и составило 626 (53,5 %; 95 %ДИ 50,5–56,5) и 369 (31,6 %; 95 %ДИ

28,8–34,4) из 1169 животных соответственно. Из 597 сельскохозяйственных животных с установленным бешенством на представителей из числа крупного рогатого скота пришлось 539 животных или 90,3 % (95 %ДИ 87,9–92,7), мелкого рогатого скота — 28 (4,7 %; 95 %ДИ 2,9–6,5), лошадей — 24 (4,0 %; 95 %ДИ 2,4–5,6), других сельскохозяйственных животных — 6 (1,0 %; 95 %ДИ 0,2–1,8). Из числа 476 диких животных количество больных бешенством лис было наибольшим и составило 282 или 59,3 % (95 %ДИ 54,7–63,9). На енотовидных собак пришлось 84 или 17,6 % (95 %ДИ 14,2–21,0), волков — 34 или 7,1 % (95 %ДИ 4,7–9,5), других диких животных с установленным бешенством — 76 или 16,0 % (95 %ДИ 12,6–19,4) из 476 диких особей с установленным бешенством.

Заключение. На протяжении всего периода наблюдения с 2013 по 2016 гг. обращаемость населения страны за АРМП, оставаясь стабильно высокой, не претерпевала существенных изменений. При этом проведенный анализ частоты обращения населения за АРМП с разными категориями повреждений, демонстрирует ежегодное увеличение регистрации 3-й, наиболее опасной, категории повреждения, с превышением в 2016 г. анализируемого показателя в 2,8 раза в сравнении с 2013 г. ($P < 0,02$), в то время как показатель обращаемости с 1-й, самой безопасной категорией повреждения, снизился в 2016 г. в сравнении с показателем 2013 г. в 1,7 раза ($P < 0,02$), что, к сожалению, может косвенно указывать на снижение настороженности населения в отношении рабической инфекции на современном этапе.

Установлено, что на протяжении всех лет наблюдения обращаемость населения за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством, была наименьшей на территории г. Минска, а также в Брестской и Витебской области, а наибольшей — в Гомельской и Минской области. В тоже время на территории Гомельской области в течение всех лет наблюдения частота обращения лиц за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством нарастала, достигнув наибольшего значения по стране в 2016 г. — $20,7^{0/0000}$, при этом аналогичный годовой республиканский показатель был превышен в 3,3 раза ($P < 0,01$), а показатель по области в сравнении с 2013 г. — в 2,7 раза ($P < 0,001$), что может служить индикатором степени вероятности осложнения эпидемиологической ситуации по рабической инфекции на данной территории на современном этапе в связи с интенсивной активизацией на протяжении ряда лет факторов эпидемиологического риска. На территории Гродненской области в 2016 г. анализируемый показатель обращаемости не отличался от среднереспубликанского ($P > 0,05$), однако по отношению к областным значениям 2014 и 2015 гг. увеличился в 3,3 раза и 3,7 раза соответственно ($P < 0,001$), что свидетельствует об активизации эпизоотического процесса на территории данного региона в настоящее время.

При анализе причин обращения населения за АРМП в связи с повреждениями, нанесенными животными с установленным бешенством, определена ведущая роль домашних животных, из числа которых количество больных бешенством домашних собак и кошек, нанесших повреждения, было наибольшим и составило 53,5 % и 31,6 % соответственно.

Литература

1. Черкасский, Б. Л. Риск в эпидемиологии / Б. Л. Черкасский — М.: Практическая медицина, 2007. — 480 с.
2. Клинико-эпидемиологические аспекты случаев бешенства в Республике Беларусь / О. Н. Ханенко [и др.] // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года : материалы XIII Межгосудар. науч.-практ. конф. /

под ред. д-ра мед. наук, проф. А. Ю. Поповой, акад. РАН В. В. Кутытева. — Саратов, 2016. — С. 256–258.

3. Эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству в Республике Беларусь (2013 год): бюллетень. — Минск: ГУ РЦГЭиОЗ, 2014. — 15 с.

4. Эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству в Республике Беларусь (2014 год): бюллетень. — Минск: ГУ РЦГЭиОЗ, 2015. — 17 с.

5. Эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству в Республике Беларусь (2015 год): бюллетень. — Минск: ГУ РЦГЭиОЗ, 2016. — 17 с.

6. Анализ оказания антирабической помощи населению Республики Беларусь за 2016 год. Эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по бешенству в Республике Беларусь: бюллетень. — Минск: ГУ РЦГЭиОЗ, 2017. — 22 с.

7. Антирабические вакцины. Документ, излагающий позицию ВОЗ. — 2010. — Режим доступа : http://www.who.int/immunization/documents/WHO_pp_rabies_2010_RU.pdf?ua=1 — Дата доступа : 28.08.2017.

8. Бешенство. Информационный бюллетень [Электронный ресурс]. — ВОЗ, 2017. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>. — Дата доступа : 28.08.2017.

RABIES IN THE REPUBLIC OF BELARUS. FACTORS OF EPIDEMIOLOGICAL RISK AT THE PRESENT STAGE

O.N. Hanenko, N.D.Kolomiets, O.V.Tonko

Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

An analysis was made of the population's readability of the Republic of Belarus for anti-rabies medical care in the dynamics from 2013 to 2016, including in the context of oblasts and the city of Minsk. Separately, the category of injuries was analyzed in persons who applied for anti-rabies medical care, as well as the frequency of treatment for anti-rabies assistance in connection with injuries inflicted by animals with established rabies. The leading role of domesticated animals with established rabies was identified as the main reason for seeking the anti-rabies medical care of the country's population in the analyzed period of observation.

Keywords: rabies, modern epidemiological features, factors of epidemiological risk.

Поступила 28.08.2017

ВОЗБУДИТЕЛИ ТЯЖЕЛЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В СЕЗОН 2016–17 гг.

Н.П. Шмелёва, Н.В. Сивец, Т.П. Лано, Н.В. Грибкова

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

Резюме. Изучен этиологический спектр возбудителей тяжелых острых респираторных инфекции (ТОРИ) в Республике Беларусь в период эпидемического сезона 2016–17 гг. Показано, что вирус гриппа А был наиболее распространенным возбудителем инфекций дыхательных путей у пациентов с ТОРИ среди большинства возрастных групп. Установлено, что этиологический спектр возбудителей ТОРИ зависел от стадии развития эпидемического процесса. В предэпидемический период среди возбудителей ТОРИ преобладали микопlasма пневмонии и риновирусы

(29,7 и 18,8 % соответственно), в период эпидемического неблагополучия 68,3 % ТОРИ были ассоциированы с вирусами гриппа, тогда как в постэпидемический период преобладали рино- и РС-вирусы.

Ключевые слова: Тяжелые острые респираторные инфекции, ПЦР, вирусы гриппа, возбудители острых респираторных инфекций.

Введение. Острые респираторные инфекции (ОРИ) представляют большую значимость для практического здравоохранения, поскольку на их долю приходится до 90 % заболеваемости от всей инфекционной патологии [1]. Этиологический спектр ОРИ чрезвычайно широк и включает вирусы гриппа, парагриппа, аденовирусы, респираторно-синцитиальный вирус, рино-, бока-, метапневмо- и коронавирусы. Самыми значимыми возбудителями ОРИ являются вирусы гриппа, причиняющие большой социальный и экономический ущерб. Высокая частота мутаций и способность к эпидемическому/пандемическому распространению обуславливают необходимость постоянного надзора за циркуляцией вирусов гриппа. В межэпидемический период в этиологической структуре респираторных возбудителей преобладают не гриппозные респираторные вирусы, которые вызывают заболевания во всех возрастных группах. Исследованиями последних лет показано, что разной степени тяжести респираторные заболевания (от бессимптомных форм до тяжелых форм пневмоний, требующих искусственной вентиляции легких) могут вызывать такие вирусы как бокавирус, метапневмовирус, коронавирус и др. [2, 3]. Сезонность, сходство клинических проявлений, отсутствие патогномичных симптомов затрудняют проведение ранней этиологической диагностики без лабораторных исследований. Целью данного исследования явилось изучение этиологии тяжелых острых респираторных инфекций (ТОРИ) у госпитализированных пациентов в Республике Беларусь в период эпидемического сезона 2016–2017 гг.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись назофарингеальные мазки пациентов с респираторными инфекциями, поступившие в рамках проведения дозорного надзора за гриппом в течение эпидемического сезона 2016–2017 гг. из всех административных регионов страны. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с применением набора «НуклеСорб», реакцию обратной транскрипции — с набором реагентов «РЕВЕРТАЗА-М-MuLV-50» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь). Исследования проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени с использованием диагностических наборов «ФЛУ-ген», «ОРВИ-ген» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь), «АмплиСенс® Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae — FL» (АмплиСенс, Российская Федерация). Спектр диагностируемых возбудителей включал вирусы гриппа с дифференциацией субтипа вируса гриппа А и эволюционной линии вируса гриппа В, вирусы парагриппа 1–4 типов (ПГ), адено- (АД), бока- (БоВ), метапневмо- (МПВ), рино- и респираторно-синцитиальный (РС) вирусы, а также атипичные патогены, такие как хламидофила и микоплазма пневмонии. Дифференциацию эволюционной линии вируса гриппа В проводили с использованием панели для генотипирования вирусов гриппа В (CDC, Атланта). Постановку ПЦР осуществляли на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Статистические данные о возрастной структуре пациентов с респираторными инфекциями представлены РНПЦ МТ в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновение и распространение гриппа» от 29 декабря 2012 года [4].

Результаты ПЦР-диагностики проанализированы с целью изучения сезонного распределения респираторных патогенов и их вклада в заболеваемость ТОРИ среди разных возрастных групп. Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v6.0. Рассчитывали частоту встречаемости случаев (%). Достоверность различия частоты встречаемости случаев в несвязанных выборках рассчитывали по критерию χ^2 (хи-квадрат) Пирсона при помощи модуля Nonparametrics. Достоверность различия критерия χ^2 принимали при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Согласно действующим Санитарным нормам и правилам респираторные инфекции в зависимости от степени тяжести заболевания подразделяются на острые респираторные инфекции (ОРИ), гриппоподобные заболевания (ГПЗ) и ТОРИ [4]. За период эпидемического сезона 2016–2017 гг. (с 40 недели 2016 г. по 20 неделю 2017 г.) в рамках дозорного надзора за гриппом на исследование поступило 2265 клинических образцов, среди которых ОРИ составили 49,5 %, ГПЗ и ТОРИ 27,9 и 22,6 % соответственно.

С целью определения этиологического спектра возбудителей образцы, относящиеся к категории ТОРИ были исследованы методом ПЦР. В результате проведенных исследований генетический материал респираторных патогенов был выявлен в 247 случаях (45,8 %). Как показал анализ полученных данных, в целом в этиологической структуре возбудителей ТОРИ доминировали вирусы гриппа А и риновирус (22,7 % и 17,0 % от общего количества положительных находок соответственно). Несколько реже встречались вирусы парагриппа и вирус гриппа В (11,7 и 10,9 % соответственно) (рисунок 1).

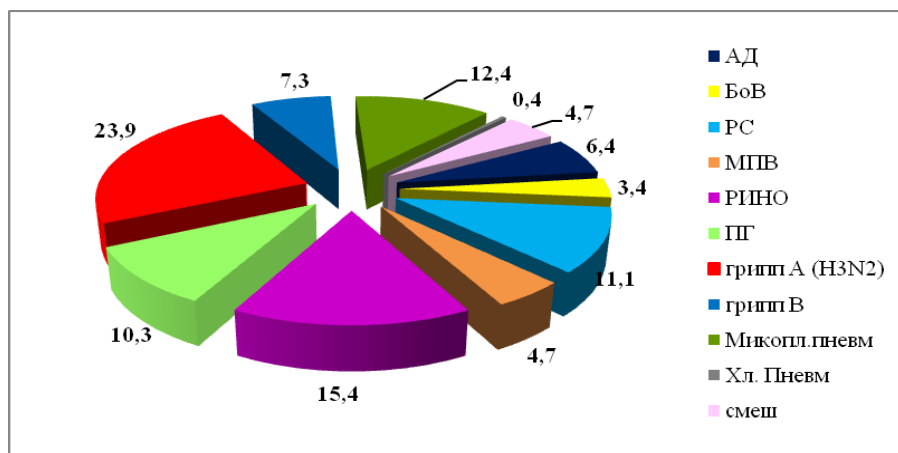


Рисунок 1. — Этиологическая структура возбудителей ТОРИ в период эпидемического сезона 2016–2017 гг.

Изучение структуры возбудителей ТОРИ в зависимости от стадии эпидемического процесса по гриппу показало, что в предэпидемический период (40 к.н. 2016 г. — 1 к.н. 2017 г.) основной вклад в формирование заболеваемости ТОРИ вносили атипичные респираторные возбудители (микоплазма пневмонии) и риновирусы (29,7 и 18,8 % соответственно) (рисунок 2).

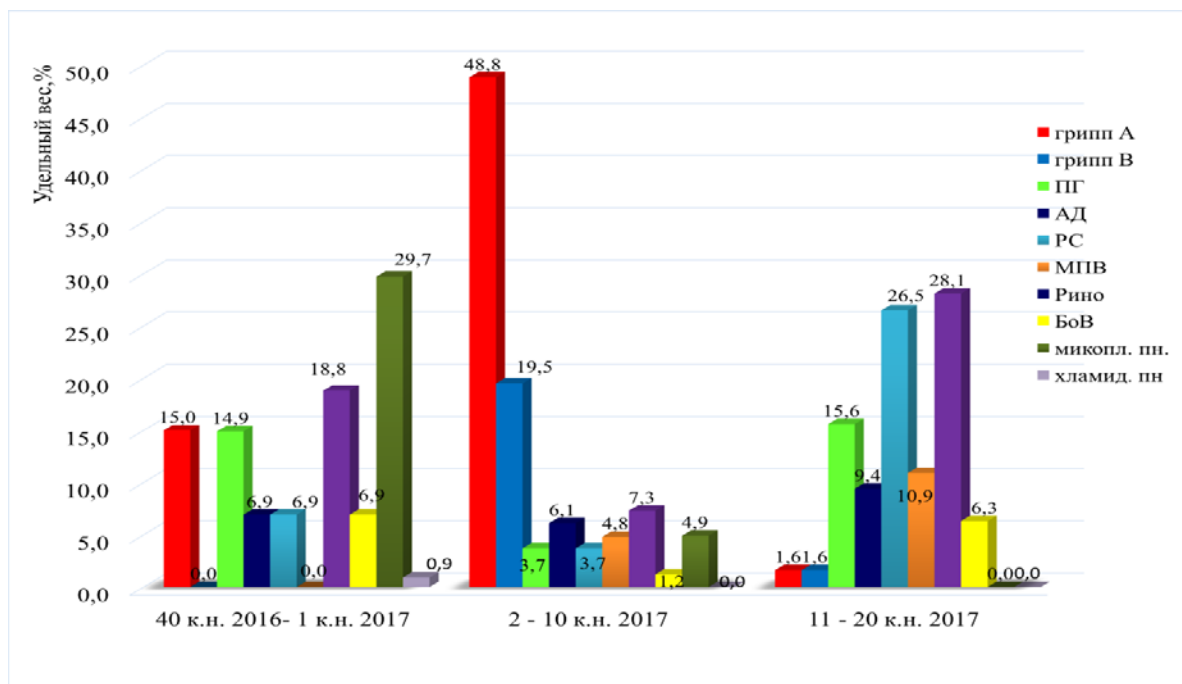


Рисунок 2. — Этиологическая структура возбудителей ТОРИ (%) на разных стадиях эпидемического процесса по гриппу (сезон 2016–17 гг.)

В период эпидемии 2017 г. (2–10 к.н.) в структуре возбудителей ТОРИ доминировали вирусы гриппа, на долю которых приходилось 68,3 % от общего числа положительных находок (удельный вес вирусов гриппа А и В составил 48,8 и 19,5 % соответственно). Также следует отметить, что 97,5 % случаев вируса гриппа А были обусловлены вирусом гриппа субтипа А(Н3N2), тогда как вирус гриппа субтипа А(Н1N1)pdm09 был выявлен лишь в одном случае ТОРИ. Все выявленные вирусы гриппа В относились к эволюционной линии В/Виктория. Другие респираторные патогены в данный период выявлялись спорадически. Таким образом, данные лабораторной диагностики свидетельствуют о том, что эпидемия гриппа 2017 г. в Республике Беларусь носила смешанный характер, и развитие эпидемического процесса было связано с циркуляцией вирусов гриппа А с доминированием вируса гриппа А(Н3N2). В конце эпидемического периода (8–10 к.н. 2017 г.) среди вирусов гриппа доминировали вирусы гриппа В линии В/Виктория. Согласно данным Глобального надзора за гриппом ВОЗ аналогичная картина развития эпидемического процесса была характерна и для большинства стран Северного полушария [5].

В постэпидемический период (11–20 к.н. 2017 г.) заболеваемость ТОРИ была связана с активной циркуляцией рино- и РС вирусов, которые лидировали в этиологической структуре возбудителей ТОРИ (28,1 и 26,5 % соответственно).

В ходе проведения исследования помимо сезонного распределения также был проанализирован вклад респираторных патогенов в развитие ТОРИ среди различных возрастных групп. Было установлено, что структура возбудителей ТОРИ различалась в зависимости от возрастной группы. Общая характеристика полученных образцов и результаты их ПЦР-диагностики приведены в таблице 1.

Таблица 1. — Частота выявления респираторных возбудителей в клинических образцах ТОРИ среди различных возрастных групп населения

Возрастная группа	Количество исследованных образцов	Количество положительных образцов	Частота выявления респираторных возбудителей, %
0–4 года	162	101	62,3
5–14 лет	70	35	50,0
15–17 лет	29	11	38,0
18–29 лет	62	27	43,5
30–64 года	159	42	26,4
Старше 65	57	20	35,0

Как видно из приведенных в таблице 1. данных, респираторные возбудители были выявлены в более чем 60 % образцах, полученных от детей возрастной группы 0–4 лет. Наименьшее количество положительных образцов оказалось среди лиц 30–64 лет (26,4 %). Это может быть обусловлено тем, что данная категория является активной трудоспособной частью населения и зачастую поздно обращается за медицинской помощью, когда вирусы, как правило, элиминируются из организма и присоединяется вторичная бактериальная инфекция.

Анализ этиологического спектра возбудителей ТОРИ в различных возрастных группах населения показал, что ТОРИ, обусловленные вирусами гриппа, преобладали среди лиц старше 65 лет (таблица 2). Среди данной категории тяжелое течение заболевания в 50 % случаев было ассоциировано с вирусами гриппа А и В ($p < 0,05$). Вирусы гриппа также лидировали в структуре возбудителей ТОРИ среди лиц 18–29 и 30–64 лет, тогда как микоплазменную инфекцию значительно чаще регистрировали у детей 5–14 и 15–17 лет (42,1 % и 36,4 % соответственно, $p < 0,05$). У детей младшей возрастной группы 0–4 лет в структуре возбудителей ТОРИ преобладали риновирусы и вирусы гриппа (27,2 %, 29,1 %, $p < 0,05$).

Таблица 2. — Удельный вес респираторных возбудителей в этиологической структуре ТОРИ в различных возрастных группах населения Республики Беларусь

Возбудитель ТОРИ	Удельный вес респираторных возбудителей по возрастным группам, %					
	0–4 года	5–14 лет	15–17 лет	18–29 лет	30–64 года	Старше 65
Грипп А	22,3	7,9	27,3	24,1	26,1	40,0
Грипп В	6,8	2,6	0	17,2	4,3	10,0
АД	10,7	0	0	3,4	8,7	10,0
БоВ	5,6	7,9	0	0	6,5	0
Рино	27,2	10,5	18,2	20,7	4,3	0
ПГ	11,7	7,9	18,2	20,7	4,3	0
РС	11,7	13,2	0	3,4	13,0	15,0
МПВ	1,9	7,90	0	6,9	8,7	0
Микоплазма пневмонии	1,9	42,1	36,4	10,3	17,4	5,0

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что вирус гриппа А был наиболее распространенным возбудителем при инфекциях дыхательных путей у пациентов с ТОРИ среди большинства возрастных групп.

Кроме того, следует отметить, что в 62,3 % случаев ТОРИ сопровождались развитием пневмонии, а в 24,3 % пациентам требовалось лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии. Согласно статистическим данным чаще всего ТОРИ осложнялось развитием пневмонии у лиц, возрастных групп 30–64 и 0–4 лет (29,7 и 26,5 % соответственно). Этиологический спектр респираторных патогенов, выявляемых у больных ТОРИ с диагнозом «пневмония» был следующий. Наиболее часто у данных пациентов методом ПЦР был выявлен генетический материал вируса гриппа А(Н3N2) и микоплазмы пневмонии (18,7 и 17,4 % соответственно, $p < 0,05$), тогда как хламидофила пневмонии была выявлена лишь в единичных случаях (рисунок 3).

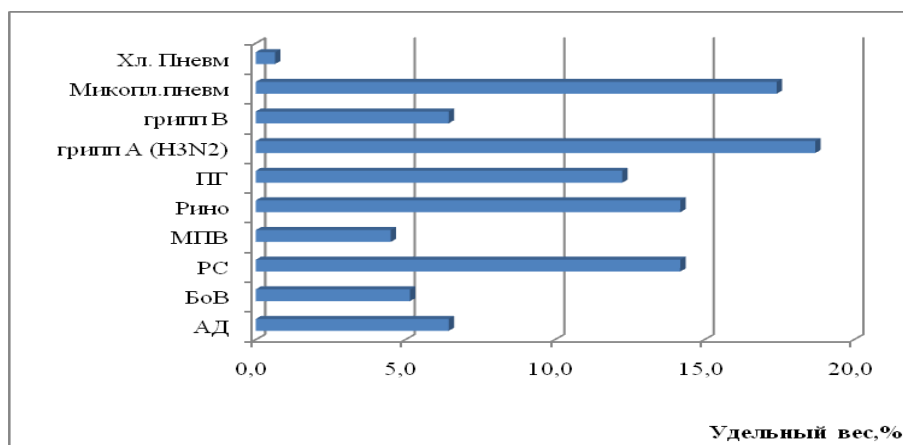


Рисунок 3. — Этиологический спектр респираторных патогенов, выявляемых у больных ТОРИ с диагнозом «пневмония»

Проведенные исследования также показали, что чаще лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии было необходимо детям 0–4 лет, которые составили более половины всех случаев ТОРИ, находящихся на интенсивной терапии (56,7 %). В этиологической структуре диагностируемых возбудителей у данных пациентов преобладал вирус гриппа А (рисунок 4).

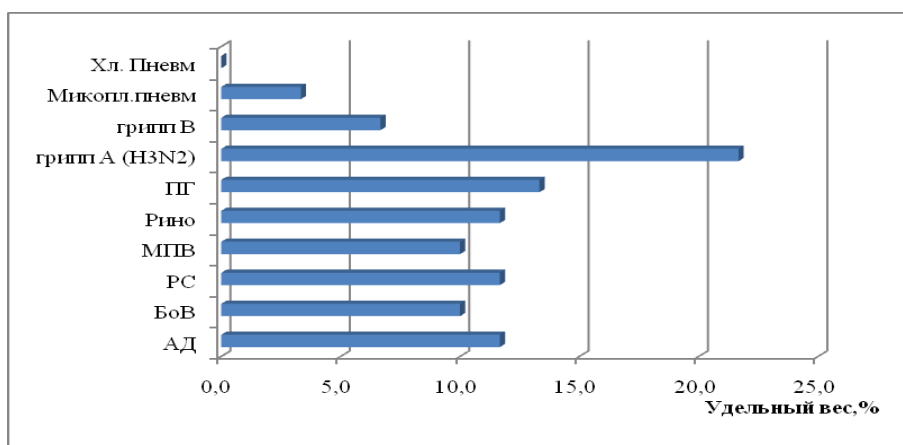


Рисунок 4. — Этиологический спектр респираторных патогенов, выявляемых у больных ТОРИ, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что чаще ТОРИ сопровождались развитием пневмонии у лиц 30–64 и 0–4 лет. В качестве этиологического агента преобладали вирус гриппа А(Н3N2) и микоплазма пневмонии (18,7 и 17,4 % соответственно). Также показано, что лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии чаще было необходимо детям 0–4 лет.

Заключение. Данные лабораторной диагностики показывают, что среди всех поступивших в течение эпидемического сезона клинических образцов к категории ТОРИ относились 22,6 %. Частота случаев ТОРИ варьировала в зависимости от стадии эпидемического процесса. В пред- и постэпидемический периоды к категории ТОРИ было отнесено лишь 6,6 и 1,3 % образцов, тогда как в период эпидемического неблагополучия к категории ТОРИ относились 35,2 % образцов.

Показано, что в 45,8 % исследованных образцов ТОРИ были выявлены респираторные патогены. В этиологической структуре возбудителей ТОРИ в целом в течение эпидемического сезона преобладали вирусы гриппа А и риновирусы (22,7 и 17,0 % соответственно). В предэпидемический период преобладали микоплазма пневмонии и риновирусы (29,7 и 18,8 % соответственно), в период эпидемического неблагополучия 68,3 % ТОРИ были ассоциированы с вирусами гриппа, преимущественно А(Н3N2), тогда как в постэпидемический период в этиологической структуре возбудителей ТОРИ преобладали рино- и РС-вирусы.

Установлено, что в 62,3 % случаев ТОРИ сопровождалось развитием пневмонии, а в 24,3 % требовали лечения в отделении реанимации и интенсивной терапии. Чаще всего пневмонии были выявлены у лиц 30–64 и 0–4 лет (29,7 и 26,5 % соответственно). В качестве этиологического агента преобладали вирус гриппа А(Н3N2) и микоплазма пневмонии (18,7 и 17,4 % соответственно). Показано, что 56,7 % от всех находящихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии были дети 0–4 лет.

Литература

1. WHO. World Health Report 2004 Statistical Annex — WHO, 2004.
2. Этиологический спектр ОРВИ у детей в Республике Беларусь в период 2010–2014 гг. / Н. П. Шмелева [и др.] // Здравоохранение. — 2014. — № 10. — С. 69–71.
3. Этиология ОРВИ среди госпитализированных детей в Республике Беларусь в 2011 и 2012 гг. / Н. В. Грибкова [и др.] // Вопр. вирусол. — 2015. — № 3. — С. 37–40.
4. Санитарные нормы и правила и гигиенические нормативы «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь»: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 12 окт. 2010 г. № 132.
5. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017–2018 northern hemisphere influenza season // Wkly Epidemiol. Rec. — 2017. — Vol. 92, No. 11. — P. 117–128.

CAUSATIVE AGENTS OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY TRACT INFECTION IN BELARUS DURING THE SEASON 2016–2017

N.P. Shmialiova, N.V. Sivet, T.P. Lapo, N.V. Gribkova

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

It was investigated the etiology of severe acute respiratory tract infection (SARI) in Belarus during the epidemic season 2016–2017. It was shown that influenza virus A was the most common pathogen in respiratory tract infection in patients with SARI among most age groups. Different pathogens were prevalent with respective seasonal distribution. The surveillance of seasonal distribution allow to identify circulation of mycoplasma pneumoniae and rhinovirus during the pre-epidemic period (29,7 and 18,8 % respectively), while during the epidemic most SARI cases (68,3 %) were associated with influenza viruses, predominantly A(H3N2). Rhinovirus and respiratory syncytial virus were the most common pathogens in the post-epidemic period.

Keywords: severe acute respiratory infections, PCR, influenza viruses, causative agents of acute respiratory infections.

Поступила 06.10.2017

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ САМОСБОРКИ АМИЛОИДОВ Аβ40, Аβ42, ПРИОННОГО PrP₂₇₋₃₀ БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛИЦ С ДИСТРОФИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

А.Н. Асташинок¹, Н.Н. Полещук¹, Т.В. Докукина², Л.В. Рубаник¹

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

²ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Минск, Беларусь

Резюме. Из клинического (кровь) и аутопсийного материала (ткань мозга) выделены патологические белковые компоненты (амилоиды Аβ40, Аβ42 и PrP₂₇₋₃₀ белок). Дана характеристика кинетики полимеризации β-амилоидов, прионного белка при их предобработке меняющимися физико-химическими факторами (температурный режим, величина рН, использование 2 % додецилсульфата натрия и протеиназы К). Моделировались условия, влияющие на соотношение анионных и катионных групп аминокислот в нативных белковых молекулах и их конформацию, обуславливающие устойчивость к денатурации. С использованием электронной и атомно-силовой микроскопии (АСМ) охарактеризована динамика формирования амилоидных фибрилл из наноструктур. Описана организация олиго- и полимеров белковых ассоциаций, образующихся на различных стадиях агрегации. Полученные результаты отражают тонкие структурные механизмы конформационного перехода и агрегации белковых молекул, формирующих амилоиды при развитии дегенеративного процесса в центральной нервной системе.

Ключевые слова. β-амилоиды, PrP₂₇₋₃₀ белок, наноскопический анализ, идентификация.

Введение. Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) имеют колоссальную медико-социальную значимость и являются одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения [1, 2]. Это обусловлено неуклонным ростом случаев болезни Альцгеймера (БА), сосудистой деменции (СД), болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза и т.д. [3]. Особую значимую роль среди них занимают прионные заболевания — болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), новый вариант БКЯ, амиотрофический лейкоспонгиоз (АЛ) и др. [4]. Общностью всех этих НДЗ является: 1) существование длительной латентной стадии (от 5 до 30 лет), характеризующейся отсутствием выраженной клинической симптоматики; 2) постепенно прогрессирующее (лавинообразное) нарастание когнитивных изменений на фоне обширной гибели нейронов; 3) атрофия отдельных областей головного мозга; 4) формирование внутрицеребральных отложений, состоящих из конформационно-измененных белков, образующих характерные аномальные амилоидные включения или фибриллярные конгломераты.

Следует отметить, что трансформация латентной формы нейродегенеративного процесса в развернутую клиническую стадию происходит только после гибели не менее 40–60 % нейрональных клеток [5]. Поэтому оказание медицинской помощи пациентам рационально проводить именно в доклинической стадии. Одним из возможных подходов в констатации начала развития заболевания является

выявление факторов или предикторов, обуславливающих конверсию белковых молекул из стабильного их состояния в конформационно-измененное.

В этой связи актуальным является разработка подходов для визуализации и идентификации разноразмерных белковых компонентов (β -амилоидов и их промежуточных структур, прионного PrP₂₇₋₃₀ белка) в клиническом материале в их нативном состоянии. Это возможно с использованием методов высокоразрешающей электронной (ЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ), которые позволяют изучать нанодоменную организацию патологических белковых компонентов, различать мономеры и димеры амилоидогенных белков, а также исследовать последовательность событий и выявлять закономерности, происходящие при переходе мономеров в олигомеры и нерастворимые фибриллярные структуры [6]. Примечательно, что подавляющее большинство экспериментальных работ, посвященных изучению с помощью ЭМ и АСМ агрегации β -амилоидов и прионного белка выполнено на рекомбинантных (синтетических) их аналогах. Данные по исследованию структурной организации и полимеризации нативных форм патологических белковых компонентов немногочисленны.

Цель работы: используя ультраструктурный анализ в сочетании с наноскопией охарактеризовать динамику полимеризации наноразмерных патологических белковых компонентов (β -амилоидов A β 40, A β 42, белка PrP₂₇₋₃₀) в амилоидоподобные фибриллярные структуры.

Материал и методы исследования.

Аутопсийный материал. Анализу подвергнуты аутопсийные образцы ткани людей (n=2), умерших с клинически и патологоанатомически-подтвержденными диагнозами БА и БКЯ.

Клинический материал. Дополнительно для выделения прионного PrP₂₇₋₃₀ белка исследован клинический материал (кровь) 54 пациентов (возраст 61–89 лет) с прогрессирующими нейродегенеративными заболеваниями различного генеза, находившихся на лечении в ГУ «РНПЦ психического здоровья» (Минск, Республика Беларусь).

Возбудитель. В работе использовали эталонный штамм скрепи — 263К (инфекционный титр — 6,5 LD₅₀/мл), полученный от доктора Jean-Philippe Deslys (Департамент нейропатологии, Франция). Также использовали штаммы: БКЯ (шт. БКЯ-ДВ, РБ, титр — 5,5 LD₅₀/мл). Все штаммы адаптированы к мозговой ткани сирийских хомячков, хранятся в 10 % суспензии ткани мозга при -70°C.

Рекомбинантные белки. Использовали коммерческие β -амилоиды A β 40 (ab82797, Abcam) и A β 42 (ab82797, Abcam), которые предварительно разводили в 50 мМ Трис-буферном растворе (рН 7,0) до концентрации белка 50 мкг/мл и разделяли на серию аликвот.

Пробоподготовка аутопсийного и клинического материала. Для выделения прионного PrP₂₇₋₃₀ белка использовалась более жесткая ступенчатая методика обработки материала, предусматривающая необходимость разрыва анионных и катионных групп аминокислот полимеризованных филаментозных белковых до отдельных их олигомеров.

Микросомальные мембранные фракции получали из аутопсийных образцов мозга. Готовили 10–кратные их разведения на 0,01 М трис-буферном растворе, рН 7,4 (от 10⁻¹ до 10⁻¹⁰), отбирали аликвоты и подвергали их обработке тергитолом, 2 % додецилсульфатом натрия, протеиназой К (10 мкг/мл) или только протеиназой К (10 мкг/мл) с длительностью экспозиции 1 или 2 ч при температуре 24 и 37 °С и рН 7,4.

Выделение β -амилоидов (A β 40, A β 42) из аутопсийного материала осуществляли по методу Rostagno A. и Ghiso J. [7].

Выделение белка PrP₂₇₋₃₀ из лимфоцитарной фракции плазмы крови пациентов с НДЗ. 5 мл крови с гепарином (25–50 Ед/мл) разводили фосфатно-солевым буфером (ФСБ, рН 7,4) в соотношении 1:3. Разведенную кровь наслаивали на градиент фиколл —урографин. Пробы центрифугировали при 400 об/мин в течение 30 мин. После центрифугирования собирали в отдельную пробирку интерфазное кольцо, содержащее лимфоциты, разводили ФСБ (в соотношении 1:1) и снова центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Осадок дважды промывали ФСБ. Выделенные лимфоциты лизировали в течение 2 ч тергитолом (NP40S, Sigma), содержащем 0,25 % нонидет. Затем пробы обрабатывали буфером для переваривания (ФСБ, рН 7,4), содержащим 2 % додецилсульфат натрия и далее протеиназой К — 10 мкг/мл. Ферментативное переваривание проводили в течение 6 ч при 37°C. Ингибирование активности фермента осуществляли путем внесения диметилсульфоксида (ДМСО) (разведение 1:200) и инкубации его в растворе биопроб не менее 1 ч.

Подложки. Слюда. Процедуру получения аминослюды осуществляли путем модификации свежесколотой ее поверхности аминогруппами в парах 3-аминопропилтриэтоксисилана с последующей ее обработкой 10 мМ р-ром MgSO₄. На подготовленную поверхность наносили фракции β-амилоидов (разведение 10⁻¹–10⁻¹⁰) в 0,01 М ФСБ (рН 7,0) с экспозицией на подложке в течение 60 мин, 80 мин, 120 мин, 220 мин при температурах 24 или 37°C. Отмывку образцов проводили трехкратно дистиллированной водой.

Кремний. Использовали пластины монокристаллического кремния, которые готовили путем гидрофиллизации при нагревании в смеси H₂O:H₂O₂:NH₄OH (в отношении 5:1:1) в течение 10–15 мин при температуре 72°C с последующим тщательным промыванием бидистиллированной водой и высушиванием в атмосфере азота [8].

4) *Электронная микроскопия.* Окрашивание образцов (прионного PrP₂₇₋₃₀ белка — разведение 10⁻¹–10⁻¹⁰; β-амилоидов) проводили 1,5 % р-ром фосфорновольфрамой кислоты или 2 % р-ром уранилацетата в течение 1–2 мин. В качестве подложки для исследования использовали тонкую формаваровую пленку, обработанную дополнительно углеродом. Анализ проводили на электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ и инструментальных увеличениях x120000–x300000. Количественный анализ частиц проводили с использованием программного модуля ITEM 5.0 (Olympus). При работе с полученным изображением участок, содержащий искомую белковую частицу выделялся круговой маской и рассчитывался спектр Фурье с последующей низкочастотной фильтрацией.

5) *Атомно-силовая микроскопия.* АСМ-изображения поверхности образцов получали на воздухе в режиме прерывистого контакта с помощью микроскопа Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, США), оборудованного J-сканером. Были использованы иглы из кремния с резонансной частотой ~315 кГц. Разрешающая способность метода составила примерно 0,1–1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали. Обработку изображений проводили с использованием модуля Femtoscan online (версия 2.2.94).

Статическая обработка результатов. Обработка данных выполнена с использованием пакета программ Statistica v 7.0. При обработке данных вычисляли среднеарифметические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий числовых результатов по критерию Фишера-Стьюдента. В зависимости от вида распределения изучаемых количественных переменных результаты их обработки представлены средним значением и стандартным отклонением (M±σ). Разницу считали достоверной при P<0,05.

Результаты исследования и обсуждение.

Ультроструктурный анализ наноразмерных форм β -амилоидов и прионного PrP₂₇₋₃₀ белка. На первоначальном этапе с использованием электронной микроскопии исследована организация наноструктур A β 40, A β 42 и PrP₂₇₋₃₀ белка. Показано, что в анализируемых фракциях β -амилоидов выявлялись преимущественно глобулы длиной 70–90 нм и шириной 10–12 нм. Следует отметить, что с обнаруженными глобулами тесно контактировали более мелкие сферические частицы со средними размерами 10–12 нм. Последние, вероятно, соответствовали моно- или димерной формам A β -амилоидов. Известно, что олигомеры, образованные β -амилоидами, существуют в динамическом равновесии с мономерной формой. Эти олигомеры образованы 2–4-мя мономерами для A β 40 и 5–6 для A β 42 и являются относительно-неструктурированными, но обладают цитотоксическими свойствами [9].

Более гетерогенные наноразмерные белковые ассоциаты выявлены при анализе фракций прионного PrP₂₇₋₃₀ белка (разведение – 10^{-1} – 10^{-10}) (рисунок 1). Некоторые из наноструктур имели вид сфер диаметром 60–80 нм, другие были похожи на бусинки, натянутые на «нить» или стержень размером 100–120 нм, при этом индивидуальные бусинки, имели диаметр 8–9 нм, третьи формировали сложноорганизованные кольцевые структуры, образованные, по-видимому, замыканием элементов, похожих на сферы на нити с шагом спирали 6–7 нм.

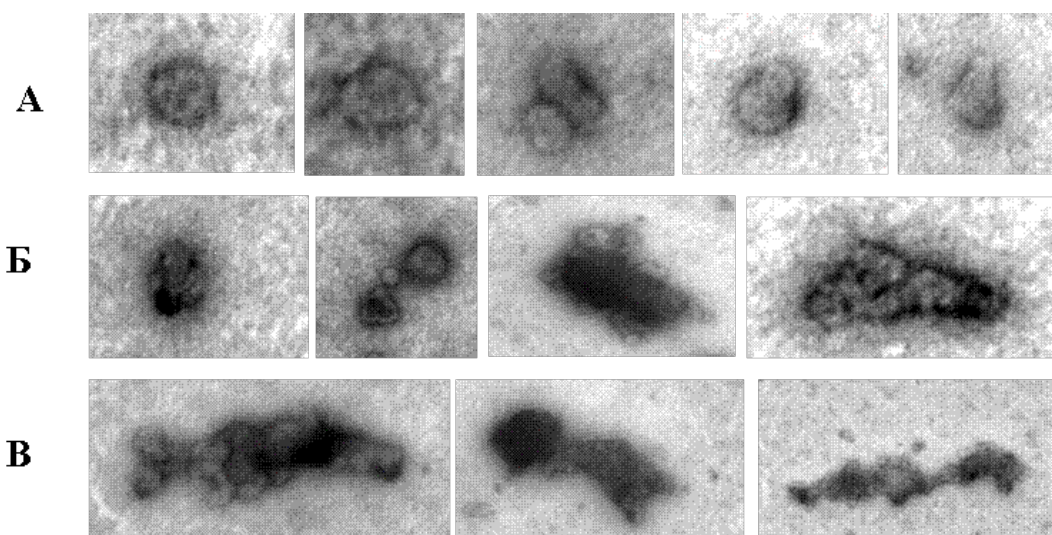


Рисунок 1. — Электронные микрофотографии олигомеров (а, б), аморфных агрегатов (в) образуемых прионным PrP₂₇₋₃₀ белком после детергентной обработки и протеиназой К. Негативное контрастирование 1,5 % р-ром фосфорновольфрамовой кислоты. Масштабный отрезок 100 нм

Следует отметить, что в мембранных фракциях ткани мозга после обработки лишь протеиназой К (10 мкг/мл) были обнаружены тонкие филаментозные структуры длиной до 400–600 нм. Все эти агрегаты, соответствовали, вероятно, фибриллоподобным структурам, описанным ранее в работах [6, 9].

Таким образом, показано, что наноразмерные структуры β -амилоидов и прионного PrP₂₇₋₃₀ сходны по ультроструктурной организации, но не идентичны между собой. Следует отметить, что выявленные различные белковые ассоциаты PrP₂₇₋₃₀ можно получать и при предобработке другими химическими агентами (1М р-ром мочевины, 2М гуанидинхлоридом, 0,25 % гипохлоритом натрия и т.д.). В тоже время высокие концентрации хаотропных соединений не позволяют получать описанные

выше глобулярные частицы, т.к. нарушают целостность третичной структуры белка и конвертируют его перевод в денатурирующее состояние.

Наноскопический анализ полимеризации наноразмерных β -амилоидов на активированных сенсорных покрытиях. Для подтверждения выявленных белковых структур при электронно-микроскопическом анализе дополнительно использовали АСМ. На первоначальном этапе исследована динамика полимеризации β -амилоидов (А β 40, А β 42), выделенных из ткани мозга.

Проведены экспериментальные исследования по выбору времени (4 исходных или реперных точек), диапазона температуры (24–37 °С), концентрации пептидов (30 или 40 мкМ) и величины ионной силы (рН 7,0) агрегации β -амилоидов на гидрофилизированной кремниевой и слюдяной поверхностях. В таблице 1 представлены результаты измерения линейных размеров белковых агрегатов в зависимости от времени инкубации и температуры. Показано, что средний диаметр частиц увеличивался в течение первых двух часов до 79,2±17,4 нм (ширина) и 4,3±2,2 нм (высота). Дальнейшая инкубация белковых фракций до 220 мин приводила к росту линейных размеров агрегатов β -амилоидов, причем средний диаметр агрегатов увеличивался гораздо быстрее при повышении температуры. Так, средний диаметр частиц после 220 мин инкубации увеличился до 400–600 нм при температурах 37 °С. Наибольшие размеры агрегатов достигались при температуре 37°С (p=0,002, P<0,05).

Таблица 1. — Линейные размеры (ширина — b, высота — h) агрегатов β -амилоидов А β 40, А β 42, измеренные на кремниевой и слюдяной поверхностях при различном времени экспозиции и диапазоне температур (24°С, 37°С)

Анализируемые пептиды	Температура инкубации	Время инкубации, мин			
		60	80	120	220
А β 40/А β 42	24°С	*b-17,21±2,9 нм h-3,3±1,9 нм	b-44±2,7 нм h-3,8±1,1 нм	b-79,2±17,4 нм h-4,3±2,2 нм	b-205,6±6,7 нм h-6,6±2,1 нм
	37°С	b-20,5±4,6 нм h-3,4±1,3 нм	b-68,5±2,5 нм h-5,6±1,7 нм	b-105,6±6,9 нм h-8,5±0,6 нм	b-343,5±14,2 нм h-15,2±1,6 нм

Примечание * — показаны средние арифметические значения (в нм) и стандартные отклонения по результатам 40 независимых измерений

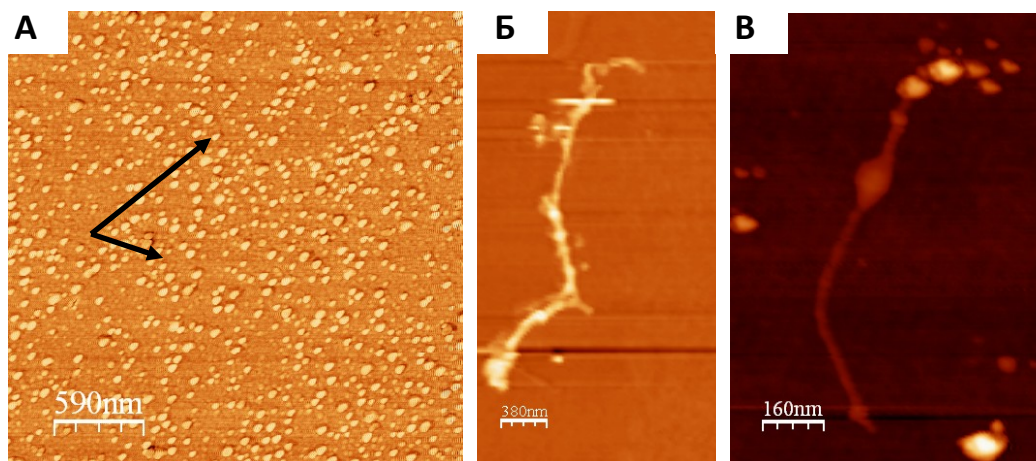
Образование упорядоченных фибриллоподобных структур белковых молекул А β 40, А β 42 происходило из мономерных частиц (2–3 нм), которые соединялись друг с другом и образовывали олигомеры. По данным АСМ линейные размеры олигомеров составили (ширина — 79,2±17,4 нм, высота 4,3±2,2 нм). Последние в дальнейшем (>220 мин) полимеризовались в более высокоорганизованные структуры — протофибриллы. Размер протофибриллы колебался (от 400 нм до 700 нм) в зависимости от времени экспозиции образца на подложке.

Таким образом, на основании АСМ-анализа можно сделать вывод, что, фракции β -амилоидов, находясь в моно- или димерной форме агрегируют при повышении температуры до 37°С в течение первых 3 часов при величине ионной силы (рН 7,0) и концентрации белка 30 или 40 мкМ. Полученная агрегационная модель полимеризации патологических белковых компонентов может отражать динамику формирования амилоидных фибрилл из отдельных наноструктур в ЦНС.

АСМ-анализ полимеризации прионного PrP₂₇₋₃₀ белка. При обработке мембранных фракций предварительно детергентами тергитолом, 2 % додецилсульфатом натрия с последующим внесением протеиназы К выявлялись только

глобулярные структуры PrP₂₇₋₃₀ белка (60–80 нм), имеющие более исчерченную поверхность (рисунок 2 А).

Однако при внесении в анализируемые фракции только протеиназы К (10 мкг/мл) с длительностью экспозиции 1 или 2 ч и при температуре 24 или 37°C и рН 7,4, отмечались фибриллярные структуры длиной 600–800 нм и высотой от 8–10 нм (рисунок 2 Б-В).



А — глобулярные структуры белка PrP₂₇₋₃₀, выявленные после детергентной обработки и протеиназой К;

Б, В — фибриллоподобные структуры белка PrP₂₇₋₃₀, выявленные после обработки только протеиназой К

Рисунок 2. — АСМ-изображения полимеризации прионного PrP₂₇₋₃₀ белка, выделенного из микросомальных фракций мозга

Следует отметить, что в мембранных фракциях (при высоких их разведениях до 10^{-10}) были обнаружены тонкие филаментозные структуры длиной более 1 мкм. Вероятно, при более высоком разведении PrP₂₇₋₃₀ белка полимеризация происходит достаточно быстро, и образующиеся мелкие олигомеры латерально собираются по 4–6 и более в филаментозные структуры. Последние, вероятно, обладают цитотоксическими свойствами, т.к. характеризуются по данным АСМ более характерным исчерченным рельефом и упорядоченным микропрофилем.

Таким образом, полученные данные позволяют по-новому проследить динамику полимеризации и пространственную конформацию отдельных наноструктур прионного PrP₂₇₋₃₀ белка при действии химических факторов.

Обсуждение результатов. Многие белки способны образовывать амилоидные фибриллы. И, тем не менее, молекулярный механизм, лежащий в основе образования амилоидов, до сих пор остается неразгаданным. Это связано с тем, что огромное количество факторов может повлиять на конформационный переход из нативного белка в патологические агрегаты, включая высокую концентрацию белка, специфическое протеолитическое расщепление, мутации, взаимодействие с лигандами и многие другие еще не установленные факторы. Известно, что выбор между исходами агрегационных процессов определяется аминокислотной последовательностью белка и его принадлежностью к тому или иному процессу [9].

Следует отметить, что, не смотря на сходство структуры, амилоидные фибриллы разных белков могут быть устроены по-разному. Показано, что в случаях прионного белка может формироваться несколько разных по структуре амилоидных структур. Разнообразие обеспечивается за счет варьирования структуры на разных уровнях самосборки и расположения аминокислот белковой цепи (параллельно или антипараллельно) в составе β -складчатого слоя [9].

При БА и БКЯ доля нерастворимого β -амилоида в мозге увеличивается примерно в 100 раз [7]. Бляшки состоят из $A\beta$ -изоформ, преимущественно содержащих 40–42 аминокислоты, причем $A\beta_{40}$ может препятствовать полимеризации $A\beta_{42}$, то есть обладает определенным защитным действием. В то же время изоформа $A\beta_{42}$ считается наиболее агрессивным ранним патологическим субстратом. Известно, что амилоидный каскад запускает в головном мозге комплекс метаболических, нейрохимических и патоморфологических изменений, в результате чего нарушается проницаемость гематоэнцефалического и гематоликворного барьеров. Амилоиды накапливаются в спинномозговой жидкости и диффундируют обратным трансэндотелиальным транспортом в кровь. Анализируя образцы ликвора и плазмы крови по наличию фракций амилоида можно констатировать глубину и степень выраженности дистрофического процесса в нейроглиа капиллярном комплексе ЦНС. В этом контексте, выявление амилоидов в плазме крови, изучение механизмов их конформационных перестроек с перекручиванием из α -спирали в β -складчатую структуру позволит разработать методы блокирования этого процесса. Кроме того, разработка и валидация прижизненных маркеров дегенеративного процесса на основе протеомики и их интеграция в единые диагностические скрининговые алгоритмы становится чрезвычайно важной задачей, для решения которой необходимы новые подходы и технологии.

В данной работе показана наноструктурная организация глобулярно-фибриллярных амилоидов $A\beta_{1-42}$ и прионного белка, выделенных из крови и ткани мозга. Меняя условия обработки образцов охарактеризована динамика конформационных изменений разноразмерных белковых агрегатов, что важно как для диагностики, так и понимания их цитотоксичности при различных НДЗ.

Таким образом, полученные результаты вносят вклад в изучение механизмов индукции и регуляции амилоидогенеза, а также могут быть использованы усовершенствования подходов в детекции и идентификации патологических белковых компонентов различного генеза. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения детального механизма формирования амилоидных фибрилл, выявления определенных детерминант и факторов, вовлеченных в данный процесс и конформационных структур, обладающих цитотоксичностью.

Заключение. Дана оценка возможности идентификации патологических белковых структур ($A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ прионного PrP₂₇₋₃₀ белка) в крови и ткани мозга и описаны конформационные изменения, отражающие динамику формирования амилоидных фибрилл различного генеза. Полученные результаты путем анализа ультраструктуры и наноскопической организации $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ прионного PrP₂₇₋₃₀ белка отражают тонкие структурные механизмы перехода и агрегации патологических белков и могут быть использованы для разработки подходов к блокированию формирования амилоидных фибрилл — предикторов развития нейродегенеративного процесса.

Литература

1. Гусев, Е. И. Когнитивные нарушения при цереброваскулярных заболеваниях / Е. И. Гусев, А. Н. Боголепова. — М: Медпресс-информ, 2012. — 160 с.
2. Захаров, В. В. Когнитивные нарушения при цереброваскулярных заболеваниях / В. В. Захаров, Н. В. Вахнина // Эффективная фармакотерапия. — 2014. — № 1. — С. 14–21.

3. Захаров, В. В. Когнитивные нарушения / В. В. Захаров, Н. В. Вахнина // Возрастные нарушения памяти и внимания. *Consilium Medicum*. — 2005. — Т. 7, № 8. — С. 697—701.
4. Медуницын, В. Прионные болезни и проблемы безопасности медицинских биологических препаратов / В. Медуницын // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2005. — № 4. — С. 4–6.
5. Иллариошкин, С. Н. Современные возможности идентификации латентной стадии нейродегенеративного процесса / С. Н. Иллариошкин, А. Г. Власенко, Е. Ю. Федотова // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. — 2013. — Т. 7, № 2. — С. 39–50.
6. Физико-химические методы исследования агрегации β -амилоида / С. П. Радько [и др.] // *Биомедицинская химия*. — 2015. — Т. 61, № 2. — С. 203–218.
7. Rostagno, A. Isolation and biochemical characterization of amyloid 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 (PrP^{27–30}) при различных дементных состояниях / А. Асташонок [и др.] // *Психиатрия, психотерапия и клиническая психология*. — 2015. — № 2. — С. 11–21.
9. Nature of the amyloid-beta monomer and the monomer-oligomer equilibrium / S. Nag [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286. — P. 13827–13833.

IDENTIFICATION OF THE PATHOLOGICAL PROTEIN STRUCTURES (AMYLOIDES A β 40, A β 42, PRION PRP^{27–30} PROTEIN), ISOLATED FROM PERSONS WITH NEURODEGENERATIVE DISORDERS

A.N. Astashonok¹, N.N. Poleschuk¹, T.V. Dokukina², L.V. Rubanik¹

¹*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;*

²*Republican Research & Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus*

From the clinical (blood) and autopsy material (brain tissue) the abnormal protein components (amyloids A β 40, A β 42, prion PrP^{27–30} protein) were isolated. The kinetics of polymerization of β -amyloids, prion protein during their pretreatment by various physicochemical factors (temperature, pH, 2 % SDS and proteinase K) is characterized. Conditions that affect the ratio of the anionic and cationic groups of amino acids of the native protein molecule and its conformation, which determines the resistance to denaturation, were modeled. Using electron and atomic force microscopy (AFM), the dynamics of the formation of amyloid fibrils from nanostructures is characterized. The organization of oligo- and polymers of protein associations, formed at different stages of aggregation is described. The results reflect the fine structural mechanisms of the conformational transition and aggregation of protein molecules, forming amyloids in the development of the degenerative process in the central nervous system.

Keywords: β -amyloids, PrP^{27–30} protein, nanoscopic analysis, identification.

Поступила 06.09.2017

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ДРУГИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

А.Н. Асташинок¹, Т.В. Докукина², Л.В. Рубаник¹, Н.Н. Полещук¹

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

²ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья»,
Минск, Беларусь

Резюме. Методом иммуноферментного анализа определено количественное соотношение маркеров нейродегенерации (β -амилоидов, фосфорилированной изоформы тау-белка) в плазме крови и цереброспинальной жидкости у пациентов с болезнью Альцгеймера и другими нейродегенеративными заболеваниями (НДЗ). Апробирован подход к обнаружению с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) β -амилоидных пептидов (A β 40, A β 42) и прионного PrP₂₇₋₃₀ белка. Сконструированы сенсорные покрытия для управляемой адсорбции специфических анти-A β -поликлональных и анти-PrP-моноклональных антител. С помощью АСМ дополнительно установлено наличие прионного белка и β -амилоида A β 40 в 14,8 % и 25,9 % образцах. Показана перспективность дальнейших клиничко-лабораторных исследований и использования иммунобиочипов для дифференциации медленных вирусных инфекций центральной нервной системы.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, болезнь Альцгеймера, β -амилоидные белки, иммуноферментный анализ, тау-белок.

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) — нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующими нарушениями когнитивных функций, приводящее к тяжелой инвалидизации [1, 2]. Эпидемиологические исследования последних лет демонстрируют неуклонное увеличение частоты случаев БА у лиц старше 55–60 лет [3]. Это свидетельствует о высокой значимости данного заболевания.

Патолого-физиологически в развитии БА можно выделить несколько стадий. Первоначально отмечается фокальное разбухание аксонов на фоне накопления тау-белка, что ведет к дестабилизации микротрубочко-актиновых структур. В нейронах формируются парные спиральные филаменты, которые постепенно образуют нейрофибрилярные клубки. Блокируется аксональный транспорт, изменяется уровень экспрессии аполипротеина E, стимулируется продукция токсических β -амилоидных пептидов (A β 40, A β 42), которые накапливаются в ткани мозга как при генетически-детерминированной, так и при других формах БА [4]. Параллельно на фоне дистрофических процессов в микроглиоцитах происходит реактивация астроглиального комплекса нервной ткани с гиперэкспрессией глиального фибриллярного кислого белка. В нейропиле формируются амилоидные отложения в виде диффузных пресенильных и сенильных бляшек [4, 5]. При некоторых формах НДЗ, включая БА, β -амилоид и прионный PrP₂₇₋₃₀ белок откладываются не только в паренхиме мозга, но и в других элементах гемотканевого и гематоэнцефалического барьеров (ГЭБ) [6]. Таким образом с развитием патологии отмечается прогрессирующий синтез β -амилоидных пептидов, тау-белка и PrP₂₇₋₃₀.

В этой связи исследования, направленные на прижизненное определение биомаркеров (белков A β 40, A β 42, тау, PrP₂₇₋₃₀) для повышения эффективности диагностики, проведения лечебно-профилактических мероприятий и улучшения качества жизни пациентов, являются актуальными и значимыми.

Цель работы: Используя иммуноферментный анализ и атомно-силовую микроскопию выявить биомаркеры нейродегенерации (белки Аβ40, Аβ42, тау, PrP₂₇₋₃₀) в плазме крови и цереброспинальной жидкости у пациентов с различными когнитивными нарушениями.

Материалы и методы исследования. За период 2016 г. исследован клинический материал (кровь, цереброспинальная жидкость) 54 пациентов с прогрессирующим течением нейродегенеративного процесса и находящихся на лечении в ГУ «РНПЦ психического здоровья».

Выделено несколько групп пациентов согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) [7]: 1 группа — БА (подгруппы F00.0 — БА с ранним началом, F00.1 — БА с поздним началом, F00.2 — БА атипичная или смешанного типа, 73,5±3,4 лет); 2 группа — сосудистая деменция (СД) (подгруппы F01.1 — мультиинфарктная деменция, F01.2 — подкорковая СД, F01.3 — смешанная корковая и подкорковая СД, 72,7±3,5 лет); 3 группа — болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ) и другие нейродегенеративные заболевания (F02.1 — БКЯ, F02.0 — болезнь Пика, 58,3±3,2 лет). Контрольную группу составили 20 психически здоровых лиц (возраст — 54,2±3,3 года) без отягощенной наследственности и соматической патологии.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для определения маркеров (Аβ40, Аβ42, тау-белка) использовали тест-системы: Аβ40 Elisa Kit (КНВ3481, США), Аβ42 Elisa Kit (КНВ3441, США), Human Tau [pT181] phosphoELISA Kit (КНО0631, США).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Использованы кремниевые биочипы с покрытиями, которые получали методом микроконтактной печати [8]. Для детекции PrP₂₇₋₃₀ белка проводили иммобилизацию на кремниевую поверхность анти-прионных моноклональных антител, как описано ранее [9].

Для выявления белков (Аβ40, Аβ42) использовали анти-Аβ-поликлональные антитела («beta amyloid (1–40) polyclonal antibody», 44341, Invitrogen и «beta amyloid (1–42) polyclonal antibody», 44346, Invitrogen). Анализ образцов проводили на микроскопе Nanoscope IIIa («Veeco», США).

Статическая обработка результатов. Обработка данных выполнена с использованием пакета программ Statistica v 7.0. В зависимости от вида распределения изучаемых количественных переменных результаты их обработки представлены средним значением и стандартным отклонением ($M \pm \sigma$). Разницу считали достоверной при $P < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Проведен анализ соотношения маркеров нейродегенерации у пациентов с различными НДЗ. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Уровень белков Аβ40, Аβ42 и тау в плазме крови у пациентов с БА и другими НДЗ

Исследуемые группы пациентов	под-группы	Плазма крови (концентрация биомаркеров, пг/мл)		
		Аβ40	Аβ42	Фосфорилированный тау-белок
Болезнь Альцгеймера (БА) n=28	F00.0	*13,4±1,2	4,3±1,5	30,3±4,5
	F00.1	*7,81±0,5		не обнаружен
	F00.2	39,2±0,8		30,3±4,5
Сосудистая деменция (СД) n=20	F01.1	30,2±0,9	5,2±0,8	не обнаружен
	F01.2	*7,84±0,6		
	F01.3	46,5±0,8		
БКЯ и другие нейродегенеративные заболевания n=6	F02.0	32,2±0,8	4,2±0,5	не обнаружен
	F02.1	24,4±1,2		
Контрольная группа n=20		40–50	0–10	не обнаружен

Примечание: * — различия достоверны между группами 1 (подгруппы F00.0, F00.1), группой 2 (подгруппы F01.1, F01.2) по сравнению с контрольной группой при $p=0,001$ ($P<0,05$)

Результаты показали, что во всех анализируемых группах уровень биомаркеров варьировал. В 1-ой группе (подгруппа F00.1) концентрация амилоида Аβ40 в плазме находилась на уровне минимальных пороговых значений (7,81±0,5 пг/мл) и была в 6 раз ниже по сравнению с контрольной группой ($p=0,001$, $P<0,05$). Это свидетельствовало о том, что у этих пациентов нарушен механизм трансэндотелиального выведения интрацеребрального амилоида (Аβ40) в кровяное русло. Патологическая изоформа тау-белка определена в подгруппах F00.0 и F00.2. В тоже время концентрация амилоида Аβ40 в плазме крови у пациентов с диагнозом F00.2 соответствовала уровню контрольной группы. Согласно данным Stoothoff W. (2005) [10] β-амилоидные белки сами могут влиять на процесс фосфорилирования тау-белка в ЦНС. Основываясь на данных Krstic D. et al. (2012) можно заключить, что одновременная дисфункция тау-белка и амилоида Аβ40 в плазме крови пациентов с диагнозами F00.0 является вторичным патологическим процессом, обусловленным цитотоксическим действием β-амилоида Аβ40 [4].

Во 2-й группе отмечены вариации в уровне амилоида Аβ40. Известно, что данный белок преимущественно накапливается в области магистральных артерий и мелких кровеносных капилляров головного мозга [4, 5]. Можно предположить, что снижение уровня Аβ40 в плазме крови у пациентов подгрупп F01.1, F01.2 указывает о преобладании сосудистых нарушений ЦНС.

В 3-ей группе выявлены общие закономерности, отмеченные для групп 1 и 2. Полученные результаты свидетельствовали о том, что изменение уровня Аβ40 может происходить не только при БА, но и при других НДЗ.

Уровень амилоида Аβ42 в плазме крови во всех анализируемых группах не превышал значений (0–5 пг/мл) при допустимых в норме (0–10 пг/мл). Следует отметить, что данный белок обладает наибольшими цитотоксическими свойствами и преимущественно откладывается в ткани ЦНС в виде амилоидных бляшек [5].

В этой связи актуальным является его определение на начальных этапах развития патологического процесса с целью проведения ранней терапии.

Дополнительно анализировали методом ИФА образцы цереброспинальной жидкости у части пациентов (n=9) с диагнозами F00.0, F00.1, F01.1, F01.2, F02.1. Полученные результаты, заключающиеся в снижении уровня β -амилоидов A β 40 (до 1700 пг/мл при норме 4000–5000 пг/мл) и A β 42 (до 200 пг/мл при норме 500–600 пг/мл) и повышении уровня тау-белка (≥ 150 пг/мл) свидетельствовали о длительном нейродегенеративном процессе в ЦНС у большинства пациентов. Согласно данным Krstic D. et al. (2012), определение уровня амилоида A β 40, A β 42 и фосфорилированного тау-белка в цереброспинальной жидкости позволяет дифференцировать активный нейродегенеративный процесс от других сходных патологических состояний [4].

С целью обнаружения низких концентраций патологических белковых компонентов на следующем этапе проведен АСМ-анализ проб на присутствие маркеров (A β 40, A β 42, PrP_{27–30} белок) с использованием сконструированных биочипов. С помощью АСМ установлено наличие прионного белка в 8 (14,8 %) из 54 образцов. Это может свидетельствовать о возможном участии PrP_{27–30} белка в нейродегенеративном процессе и требует необходимости дальнейшего изучения данного вопроса. Маркерный β -амилоид (A β 40) выявлен в 14 (25,9 %) из 54 анализируемых образцов. Следует отметить, что другой белок (A β 42) с использованием АСМ в исследуемом материале не детектировался. Это, как и при ИФА-анализе, вероятно, связано с тем, что β -амилоид A β 42 вовлекается в патологический процесс в ЦНС при глубоких дистрофических изменениях мозга, но в норме высвобождается во внутреннюю среду организма (кровь, цереброспинальную жидкость) только в очень низких количествах.

Таким образом, выявлены количественные различия в уровне маркеров нейродегенерации у пациентов с различными когнитивными нарушениями. Количество фосфорилированного тау-белка, белка A β 40 отражает ключевые патогенетические признаки БА. Определение концентрации этих биомаркеров в плазме крови позволяет распознавать нейродегенеративный процесс на ранних этапах до развития выраженной патологии, достигающей стадии деменции.

Заключение. Проведен анализ количественного соотношения маркеров нейродегенерации (A β 40, A β 42, тау-белок, PrP_{27–30}) в плазме крови и цереброспинальной жидкости у пациентов с БА и другими НДЗ. Методом ИФА выявлены различия в уровне амилоида A β 40 и патологической изоформы тау-белка у пациентов с БА и СД, что позволило лабораторно подтвердить клинический диагноз и установить степень выраженности патологического процесса. С использованием АСМ установлено наличие прионного белка и β -амилоида A β 40 в 14,8 % и 25,9 % образцах. Для совершенствования и дифференциации медленных вирусных инфекций ЦНС использован современный нанотехнологический подход, позволяющий эффективно выявлять низкие концентрации патологических белков в исследуемых образцах. При этом, несомненно, сочетание и сопоставление клинических, нейропсихологических и биохимических показателей позволяет получить наибольшую диагностическую значимость и обосновать подходы к ранней терапии.

Литература

1. Мхитарян, Э. Болезнь Альцгеймера и цереброваскулярные расстройства / Э. Мхитарян, И. Преображенская // Неврологический журн. — 2006. — Т. 11, № 1. — С. 31–37.
2. Емелин, А. Ю. Новые критерии диагностики болезни Альцгеймера / А. Ю. Емелин // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. — 2011. — № 4. — С. 5–8.
3. Epidemiological and economic burden of Alzheimer's disease: a systematic literature review of data across Europe and the United States of America / C. Takizawa [et al.] // J. Alzheimer's Dis. — 2015. — Vol. 43, No. 4. — P. 819–829.

4. Krstic, D. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease / D. Krstic, I. Knuesel // *Neurology*. — 2012. — Vol. 1. — P. 1—10.
5. Современные представления о патогенезе болезни Альцгеймера: новые подходы к фармакотерапии / Ю. Комлева [и др.] // *Современные технологии в медицине*. — 2015. — № 3. — С. 138–148.
6. Kellet, K. Prion protein and Alzheimer disease / K. Kellet, N. Hooper // *Prion*. — 2009. — Vol. 3. — P. 190–194.
7. Казаковцев, В. А. Психические расстройства и расстройства поведения (F00–F99) / В. А. Казаковцев, В. Б. Голанд. — М. : Прометей, 2013. — 584 с.
8. Жавнерко, Г. К. Метод микроконтактной печати, локальная модификация поверхности и интерпретация данных сканирующей зондовой микроскопии / Г. К. Жавнерко, В. Е. Агабеков // *Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : сб. докл. VII Междунар. семина.* — Минск : ИТМО НАН Беларуси, 2006. — С. 10–13.
9. Выявление белков-маркеров нейродегенерации у пациентов с когнитивными нарушениями и детекция протеазоустойчивого прионного белка (PrP_{27–30}) при различных дементных состояниях / А. Асташонок [и др.] // *Психиатрия, психотерапия и клиническая психология*. — 2015. — № 2. — С. 11–21.
10. Stoothoff, W. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences / W. Stoothoff, G. Johnson // *BBA Molec. Basis Dis.* — 2009. — Vol. 1739. — P. 280–297.

DETERMINATION MARKERS OF THE NEURODEGENERATION IN PATIENTS WITH THE ALZHEIMER'S DISEASE AND OTHER DISORDERS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

A.N. Astashonok¹, T.V. Dokukina², L.V. Rubanik¹, N.N. Poleschuk¹

¹*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;*

²*Republican Research & Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus*

The quantitative ratio of neurodegeneration markers (β -amyloids, phosphorylated tau) in blood plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases (NDD) was analyzed by enzyme immunoassays. Approaches for detection of β -amyloid peptides (A β 40, A β 42) and prion PrP_{27–30} protein using atomic force microscopy (AFM) were designed. Sensory coatings for controlled adsorption of specific anti-A β -polyclonal and anti-PrP-monoclonal antibodies have been used. Using AFM, the presence of prion protein and β -amyloid A β 40 in 14,8 % and 25,9 % of patients has been established, which is relevant for the improvement and differentiation of slow viral infections of the central nervous system.

Keywords: atomic force microscopy, Alzheimer's disease, β -amiloid proteins, ELISA, tau-protein.

Поступила 18.09.2017

АНАЛИЗ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРОВИ И ЦСЖ ПАЦИЕНТОВ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ В УЗ ГКИБ В 2012–2016 гг.

В. Н. Зайцева¹, Т. А. Рогачева¹, Л. И. Белановская¹, Л. А. Анисько¹, Н. В. Соловей²

¹УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Беларусь;

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Резюме. Проведен ретроспективный анализ микробного пейзажа возбудителей, выделенных из цереброспинальной жидкости и крови. Мониторинг показал этиологическую структуру ведущей микрофлоры у пациентов инфекционного стационара и целесообразность его проведения.

Ключевые слова: цереброспинальная жидкость, кровь, микробиологический мониторинг, микробный пейзаж, менингит.

Введение. Микробиологический мониторинг наиболее значимых биологических жидкостей организма человека — цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и крови, определение чувствительности к антибактериальным препаратам, выделенных из них микроорганизмов, как известно, способствует раннему выявлению этиологического агента, изучению особенностей популяционной структуры возбудителей, их устойчивости к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам, проведению рациональной этиотропной терапии, а также профилактике инфекционно-воспалительных заболеваний [1]. Бактериологический мониторинг позволяет получить полноценный микробный пейзаж, выявить новые варианты госпитальных штаммов микроорганизмов, вести наблюдение за их изменчивостью, определить возможные клинические случаи инфекций и предотвратить их, уменьшить число осложнений, а также способствует установлению корреляции между видовым составом микроорганизмов и инфекционной патологией, сокращению пребывания пациента в стационаре, улучшению качества оказания медицинской помощи [2].

Целью настоящего исследования было изучение микробного пейзажа и проведение анализа этиологической структуры возбудителей, выделенных из крови и ЦСЖ больных с подозрением на менингит и сепсис.

Материалы и методы. В работе использовались культуральный и микроскопический методы исследования микроорганизмов.

Биологическим материалом для микробиологического исследования служили образцы крови и ЦСЖ от 5254 пациентов. Исследование на стерильность крови и ликвора проводили с помощью автоматического анализатора гемокультур BacT/ALERT фирмы BioMerieux (Франция). Для посева биоматериала использовали флаконы BacT\ALERT FN, BacT\ALERT FA, BacT\ALERT PF с активированным углем, предназначенные для качественного определения наличия аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) в крови и других в норме стерильных биологических жидкостях.

Микробиологический посев крови и ЦСЖ проводили у постели больного с соблюдением всех правил асептики во время подъема температуры, в начале появления лихорадки, до начала специфического антибактериального химиотерапевтического лечения или через 12–24 часа после последнего введения препарата.

Посев, культивирование и выделение чистой культуры возбудителей проводили общепринятыми методами, согласно методическим рекомендациям «Микробиологические методы исследования биологического материала» от 19.03.2010, рег. № 075–0210.

Идентификацию видовой принадлежности выделенных микроорганизмов выполняли на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact фирмы BioMerieux (Франция) с помощью карт: GP (грамположительные бактерии); GN (грамотрицательные бактерии); YST (грибы); NH (нейссерии и гемофилы); ANC (большинство анаэробных трудно культивируемых бактерий, коринебактерий). Принцип идентификации основан на стандартных биохимических тестах с применением субстратов, позволяющих оценить используемые источники углерода и азота, а также ферментативную активность бактерий.

Приготовление суспензии осуществляли при помощи автоматических дозаторов и диспенсера жидкости. Стандартизацию инокулюма выполняли, используя калиброванный автоматический денситометр Vitek 2 DensiCHEK.

Данные исследования назначали пациентам, согласно утвержденным Министерством здравоохранения Республики Беларусь клиническим протоколам обследования и лечения инфекционных больных с подозрением на гнойно-септические состояния (сепсис, менингиты) и приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29.12.2015 № 1301 «О мерах по снижению антибактериальной резистентности микроорганизмов».

Результаты. В работе представлены результаты бактериологического исследования клинического материала (крови и ЦСЖ) пациентов, находившихся на лечении в инфекционном стационаре УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» (ГКИБ) г. Минска за период 2012–2016 гг. Всего на стерильность было исследовано 7 167 проб, в том числе 790 образцов ликвора и 6 377 образцов крови. Кратность взятия ЦСЖ и крови от одного пациента составила 1,1 (705 лиц) и 1,4 (4549 человек), соответственно.

Высеваемость культур микроорганизмов из ЦСЖ в среднем составила 15,3 % (всего за 5 лет выделено 108 изолятов) и в разные годы колебалась от 12,3 % до 19,4 %. Выявляемость патогенов из крови в среднем составила 7,0 %. В абсолютных цифрах больше всего гемокультур было выделено в 2015 и 2016 гг. — 91 и 92 микроорганизма соответственно (высеваемость — 9,0 % и 7,4 %). Следует отметить, что результативность микробиологических исследований для диагностики генерализованных гнойно-септических состояний у пациентов инфекционного стационара в предшествующие два года заметно повысилась в сравнении с предыдущим периодом (рисунок 1).

В ходе микробиологических исследований данного биологического материала за пятилетний период всего было выделено 427 культур. Из них общее количество выделенных микроорганизмов из крови было в три раза больше, чем из ЦСЖ (321 и 108 культур соответственно). В то же время, выявляемость при посеве ликвора была в 2,2 раза выше, чем из крови (15,3 % и 7,1 % соответственно).

Из данных, представленных на рисунке 1 видно, что в последние годы наблюдается тенденция роста числа выделенных изолятов из крови и ликвора, что, по нашему мнению, связано с более обоснованным подходом к назначению исследований и улучшением качества микробиологических исследований. За анализируемый период от общего количества микроорганизмов, выделенных из крови и ликвора, почти 70 % (298 культур) составила грамположительная флора, которая была представлена стафилококками и стрептококками (52,9 % и 16,9 % соответственно). Доля грамотрицательных бактерий составила 22,95 % (98 культур). Среди грамотрицательных палочек наиболее часто детектировались *Escherichia coli* — 7,5 % (32 изолята), грамотрицательные неферментирующие бактерии (НГОБ) — 4,2 % (18 изолятов), *Klebsiella pneumoniae* — 3,7 % (16 изолятов) (таблица 1).

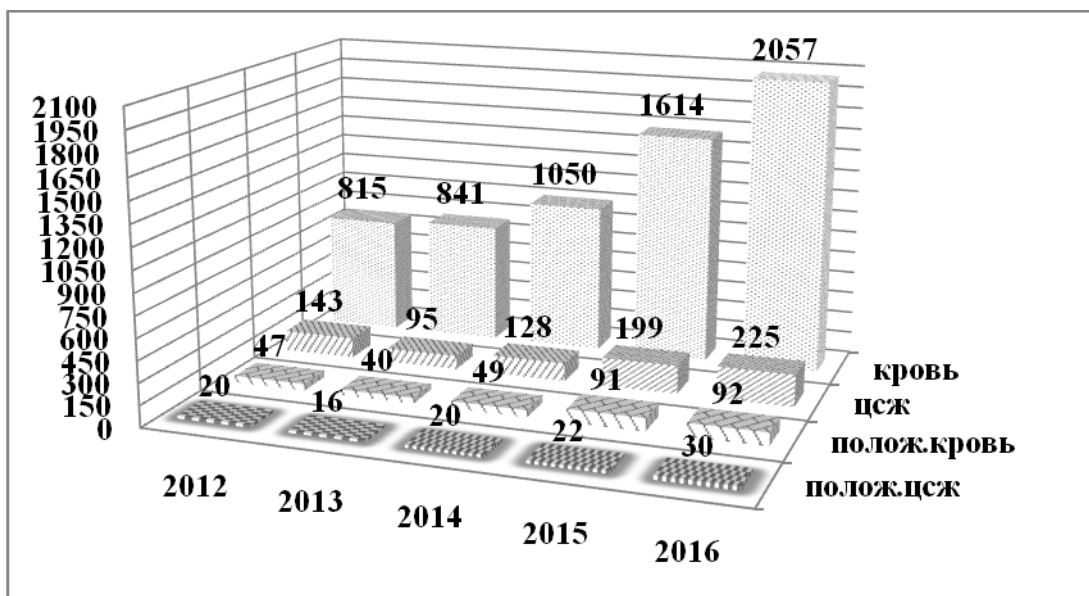


Рисунок 1. — Частота выделения микроорганизмов из ЦСЖ и крови при исследовании на стерильность за 2012–2016 гг. в УЗ ГКИБ

Дрожжеподобные грибы были выделены из 26 проб исследуемого материала, среди которых 20 культур (77 % от числа выделенных культур дрожжеподобных грибов) составили *Candida neoformans*, и 6 — *C. albicans*. За исследуемый период из крови и ликвора выделено 16 культур *Neisseria meningitidis*, причем прослеживается тенденция снижения их выделения: так, за 2012–2013 гг. было выявлено 11 культур *N. meningitidis*, а за 2015–2016 гг. только 2. Ежегодно детектировались в среднем по 2 культуры *Salmonella spp.* Спектр выделенных патогенов включал единичные изоляты *Listeria spp.* и *Haemophilus influenzae* (3 и 2 культуры соответственно).

Микробный пейзаж культур, выделенных из ЦСЖ, представлен в таблице 2. Из данных таблицы видно, что наиболее частой причиной гнойного менингита являлась также грамположительная флора, причем, с явным преимуществом выделялись представители рода *Staphylococcus*. Так, из 7 изолированных видов (47 культур) в 38 % случаев заболевание вызывал *S. aureus*. Среди выделенных культур стрептококков (n=20) значимым этиологическим агентом, вызывающим гнойный менингит 75 % (15 культур) был *S. pneumoniae*. Необходимо отметить, что в последние годы из ликвора стал выделяться *C. neoformans* (17 культур). Культуры бактерий *N. meningitidis* выявлялись из ЦСЖ чаще, чем из крови: из 16 выделенных штаммов *N. meningitidis* 11 было изолировано при посеве ликвора, среди которых 8 — *N. meningitidis group B*.

Таким образом, проведенный нами анализ микрофлоры при исследовании на стерильность крови и ЦСЖ за период 2012–2016 гг. в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» показал общую картину выделенных микроорганизмов и позволил определить спектр наиболее клинически значимых возбудителей бактериальных менингитов и сепсиса.

Обсуждение. Гнойные бактериальные менингиты, широко распространены во всем мире и отличаются не только высокими показателями заболеваемости, летальности, но и частыми осложнениями. У 10–20 % перенесших заболевание лиц в результате поражения ЦНС возникают осложнения, такие как эпилепсия, задержка умственного развития или сенсорная глухота [3, 4].

Таблица 1. — Пейзаж культур, выделенных при микробиологическом исследовании на стерильность ЦСЖ и крови в УЗ ГКИБ за период 2012–2016 гг.

Выделенная культура	Количество возбудителей по годам					Всего за исслед. период	% от общего числа
	2012	2013	2014	2015	2016		
<i>Staphylococcus spp.</i>	23	20	37	74	72	226	52,9
<i>Streptococcus spp.</i> и <i>Enterococcus spp.</i>	13	17	12	10	20	72	16,9
<i>Escherichia coli</i>	6	2	6	9	9	32	7,5
<i>Candida spp.</i> всего, в том числе:	9	1	3	8	5	26	6,1
- <i>C. albicans</i>	2	0	1	3	0	6	
- <i>C. neoformans</i>	7	1	2	5	5	20	
НГОБ	4	4	2	4	4	18	4,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1	3	5	5	16	3,7
<i>Neisseria meningitidis</i>	5	6	3	1	1	16	3,7
<i>Salmonella spp.</i>	3	2	1	1	4	11	2,6
<i>Listeria spp.</i>	0	0	1	1	1	3	
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0	0	0	1	2	
Другие условно-патогенные энтеробактерии (УПЭ)	1	3	1	0	0	5	
Всего	67	56	69	113	122	427	
%	15,7	13,1	16,1	26,5	28,6		

В зависимости от возраста, клинических форм болезни и этиологического агента показатели летальности в развитых странах составляют в среднем 3–19 % [5], а в развивающихся — 37–60 % [6, 7]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодно в мире регистрируется 1 млн. случаев гнойных бактериальных менингитов, из которых 200 тыс. заканчиваются летально [8].

Известно, что исследование ЦСЖ позволяет достаточно быстро диагностировать менингит [9], установить возбудитель заболевания, определить степень выраженности синдрома интоксикации, а также контролировать эффективность проводимой терапии [10]. При одновременной бактериоскопии проб ЦСЖ и крови в первый день госпитализации больных с менингококковым менингитом число положительных результатов может превышать 90 %, к третьему дню госпитализации этот показатель снижается до 60 % у детей и до 0 % у взрослых [11].

В ходе изучения микрофлоры, выделенной в посевах крови и ЦСЖ на стерильность, за 5–летний период наблюдений в инфекционном стационаре нами было установлено, что ведущую позицию занимают грамположительные возбудители — 69,8 %. Оставшиеся 30,2 % делят между собой грамотрицательные бактерии — 22,95 %, грибы — 6,1 % и 0,97 % — прочие единичные возбудители, что согласуется с данными литературы [12]. Значительный удельный вес *C. neoformans* среди выделенных культур связан с тем, что в УЗ ГКИБ оказывается помощь пациентам с оппортунистическими поражениями ЦНС на фоне ВИЧ-инфекции.

В подавляющем большинстве случаев выделение микроорганизмов из ЦСЖ свидетельствует об их этиологической роли [13].

Согласно рекомендациям ВОЗ, все наиболее часто выделяемые патогены разделены по уровням приоритетности: высокого уровня (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, грамотрицательные палочки, *Mycobacterium tuberculosis*, *C. neoformans*), среднего уровня (*S. agalactiae group B*), низкого уровня (*L. monocytogenes*) [8]. Как следует из полученных нами результатов, представленных в таблице 2, в посевах ЦСЖ на стерильность в 49 % случаев (53/108) были выделены патогены высокого уровня приоритетности, что согласуется с данными литературы [8].

Таблица 2. — Видовой состав культур, выделенных из ЦСЖ

Выделенная культура	Количество возбудителей по годам					Всего изолир.
	2012	2013	2014	2015	2016	
<i>S. aureus</i>	5	2	6	4	1	18
<i>S. epidermidis</i>	1	1	2	2	5	11
<i>S. hominis</i>	1	0	0	2	4	7
<i>S. haemolyticus</i>	1	0	0	1	1	3
<i>S. saprophyticus</i>	0	2	0	0	2	4
<i>S. warneri</i>	0	0	0	0	1	1
<i>S. capitis</i>	0	1	0	0	2	3
<i>S. pneumoniae</i>	3	5	0	3	4	15
<i>S. pyogenes</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Streptococcus spp.</i>	0	0	2	1	0	3
<i>Enterococcus spp.</i>	0	1	0	0	0	1
<i>E. coli</i>	0	0	1	0	1	2
<i>C. albicans</i>	0	0	0	1	0	1
<i>C. neoformans</i>	4	1	2	5	5	17
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	1	0	1
<i>S. paucimobilis</i>	0	0	1	1	0	2
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	2	0	1	3
<i>N. meningitidis (не аггл.)</i>	0	0	0	1	0	1
<i>N. meningitidis Group C</i>	1	1	0	0	0	2
<i>N. meningitidis Group B</i>	3	2	2	0	1	8
<i>Listeria spp.</i>	0	0	1	0	1	2
<i>H. influenzae</i>	1	0	0	0	1	2
Всего:	20	16	20	22	30	108

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что микробиологический мониторинг и лабораторная диагностика гнойных бактериальных менингитов любой этиологии позволяют установить спектр циркулирующих патогенов, что способствует своевременному назначению адекватного лечения, а также проводить корректировку антибактериальной терапии.

Выводы. Как свидетельствуют полученные в исследовании результаты, в этиологической структуре инфекций стационара (n=427) преобладала грамположительная микрофлора (~70 %); в посевах ЦСЖ выделялись возбудители высокого уровня патогенности (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*), выявляемость которых в среднем составила 15,3 %.

Изучение этиологической структуры микроорганизмов, выделяемых из стерильных биотопов стационарных больных, является важной и неотъемлемой частью любой клиники, вовремя предпринятые лечебные и профилактические меры спасут жизнь пациенту, приостановят развитие антибиотикорезистентности и распространение патогенов в условиях стационара.

Литература

1. Скала, Л. З. Организация системы микробиологического мониторинга микробного пейзажа и уровня антибиотикорезистентности в лечебных учреждениях / Л. З. Скала // Эпидемиол. инфекц. болезни. — 2002. — № 6. — С. 16–19.
2. Организация и проведение мониторинга антибиотикорезистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам в организациях здравоохранения Республики Беларусь : инструкция по применению : утв. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь 16.03.2012, № 292.
3. The epidemiology of bacterial meningitis in Kosovo / S. A. Namani [et al.] // J. Infect. Dev. Ctries. — 2014. — Vol. 8, № 7. — P. 823–830.
4. Титов, Л. П. Менингококковая инфекция: современное состояние проблемы / Л. П. Титов // Здравоохранение. — 2010. — № 12. — С. 15–23.
5. Watson, M. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid / M. Watson, M. G. Scott // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41. — P. 343–360.
6. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis / M. C. Brouwer [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. — 2010. — Vol. 23, No. 3. — P. 467–492.
7. Гнойный менингит и менингоэнцефалит в пожилом и старческом возрасте / Л. С. Бондарев [и др.] // Терапевт. арх. — 1991. — Т. 62, № 11. — С. 60–62.
8. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии / J. Vandepitte [et al.]: пер. с англ. — Женева: ВОЗ, 1994. — 132 с.
9. Виленский, Б. С. Неотложные состояния в невропатологии: руководство для врачей / Б. С. Виленский. — Л.: Медицина, 1986. — 304 с.
11. Демина, А. А. Заболеваемость, обусловленная *Haemophilus influenzae* типа b и вакцинопрофилактика этой инфекции / А. А. Демина, В. И. Покровский, И. М. Самсонова // Журн. микробиол. — 1996. — № 5. — С. 99–104.
12. Митрохин, С. Д. Микробиологическая диагностика инфекций кровяного русла на современном этапе развития клинической микробиологии / С. Д. Митрохин // Инфекции и антимикроб. тер. — 2002. — Т. 4, № 1. — С. 27–29.
13. Цереброспинальная жидкость и перспективы ее изучения / Н. В. Скрипченко [и др.] // Рос. вест. перинатол. и педиатрии. — 2011. — № 6. — С. 88–97.

ANALYSIS OF MICROBIAL SPECTRUM AGENTS ISOLATED FROM PATIENTS BLOOD AND CSF DURING 2012–2016 IN MINSK CLINICAL HOSPITAL OF INFECTIOUS DISEASES

V. N. Zaitseva¹, T. A. Rogacheva¹, L. I. Belanovskaya¹, L. A. Anisko¹, N. V. Solovey²

¹Minsk Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Microbiological monitoring carried out in Minsk Clinical Infection Hospital. The monitoring showed the etiological structure of the leading microorganisms of the hospital.

Keywords: blood, CSF, microbial landscape, microbiological monitoring, meningitis.

Поступила 22.08.2017

СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ ЛЯРВАЛЬНЫХ ГЕЛЬМИНТОЗОВ ЧЕЛОВЕКА (ЭХИНОКОККОЗ И АЛЬВЕОКОККОЗ)

Иванова М.А.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Резюме. Эхинококкозы человека характеризуются хроническим, непрерывно прогрессирующим течением, часто бессимптомным до развития инкурабельного состояния и смерти. Ранний диагноз остается залогом хорошего прогноза для пациентов. Диагностика эхинококкозов основывается на эпидемических предпосылках, клинических данных и, прежде всего, на результатах методов визуализации. Наиболее информативными признаются в настоящее время компьютерная томография и магнитно-резонансная томография.

Ключевые слова: эхинококкоз, альвеококкоз, визуализация, магнитно-резонансная томография, компьютерная томография.

Введение. Гидатидный (Э) и альвеолярный (А) эхинококкозы входят в группу из семнадцати «забытых тропических болезней» и подгруппу «забытых зоонозов», находящихся на особом контроле ВОЗ с исполнением поэтапного плана профилактики и борьбы (так называемая «дорожная карта»). Заболевания характеризуются хроническим, непрерывно прогрессирующим течением, часто бессимптомным до развития инкурабельного состояния и смерти [1].

По оценкам, опубликованным в 2010 году, Э ежегодно приводит к потере от 1 до 3 млн. ДАЛИ, а альвеолярный эхинококкоз — примерно 650 000 ДАЛИ. Один ДАЛИ (год жизни, скорректированный на инвалидность) можно рассматривать как один потерянный год «здоровой» жизни [2].

Человек становится промежуточным хозяином эхинококков (*E. granulosus*) или альвеококков (*E. multilocularis*) при случайном заражении. Имеющиеся данные позволяют считать, что только у 1–10 % человек развивается инвазия после поглощения яиц этих цестод, в большинстве других случаев заражения происходит элиминация возбудителя под воздействием механизмов врожденного или приобретенного иммунитета [3].

Поглощение с водой, пищей или контактно яиц этих цестод, которые выделяются с фекалиями в основном собак, приводит к развитию метацестод (личинок) цепня, имеющих специфическое строение и тенденцию к медленному, но прогрессивному росту. Метацестоды могут поражать любой орган человека, однако в 75 % случаев кисты развиваются в печени, далее по частоте следуют легкие. Личинки *E. granulosus* имеют форму однокамерной сферической кисты, растут равномерно концентрически со скоростью 10–50 мм в год, отодвигая окружающие ткани человека. Иногда внутри кисты, достигающей размеров более 10 см в диаметре появляются множественные дочерние мелкие кисты, заполняющие полость материнской кисты. Инкубационный период и клиническая картина зависят от пораженного органа, количества личинок и их влияния на витальные структуры.

Альвеококкоз имеет целый ряд отличий от эхинококкоза, начиная с эпидемических особенностей: основной окончательный хозяин — рыжая лисица, заражение происходит чаще в сельской местности или при посещении леса. Инвазирование приводит к медленному развитию в печени человека метацестоды *E. multilocularis*, которая имеет свойства злокачественной опухоли, в том числе инфильтративный рост, вплоть до прорастания в соседние органы и склонность к отдаленному метастазированию гематогенным или лимфогенным путями [4].

Метацестода альвеококка представляет собой сплошную мелкоячеистую массу, иногда с центральным некрозом или кальцинатами. Очаг поражения всегда состоит из настолько мелких кист (1–3 мм в диаметре), что они не визуализируются при использовании компьютерной (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ). Эта особенность кардинально отличает Э от А. К сожалению, врачи как в эндемичных, так и в малозндемичных странах не понимают различий между А и Э, что приводит к несвоевременной диагностике и неадекватному лечению. При раннем диагнозе А возможно радикальное удаление очага. Напротив, поздний диагноз ведет к пожизненной терапии бензимидазолами (альбендазол, мебендазол) или трансплантации печени. В большинстве эндемичных стран А остается фатальным заболеванием, непосредственными причинами смерти выступают септический шок, осложнения после больших хирургических вмешательств на печени, печеночная недостаточность, осложнения при вторичном циррозе печени и церебральный метастатический процесс [5].

Диагностика Э и А основывается на эпидемических предпосылках, клинических данных и, прежде всего, на результатах методов визуализации. Вспомогательную роль играют гистоморфологические, молекулярные и серологические методы [6].

КТ и МРТ отличаются, по сравнению с ультразвуковым методом, более высокой чувствительностью, а при определенных локализациях — точностью топической и дифференциальной диагностики. Общая точность КТ/МРТ-диагностики при эхинококкозе, по данным литературы, превышает 95 %. Что касается чувствительности методов визуализации, то минимальный размер кисты печени, выявленной при ультразвуковом исследовании, составляет 5 мм; внеорганных кисты брюшной полости — 20 мм; кисты легкого, выявленной при рентгенографии, — 7 мм; кисты, обнаруженной при компьютерной томографии — 4 мм [7].

Цель исследования: показать особенности и варианты развития метацестод *E. granulosus* и *E. multilocularis* различных локализаций при визуализации методами компьютерной томографии и магнитно-резонансной томографии.

Материал и методы исследования. Использовались данные визуализации (КТ, МРТ) пациентов, консультированных для постановки или подтверждения диагноза лярвальных гельминтозов и выбора направления лечения (консультативный прием на кафедре инфекционных болезней БГМУ).

Результаты исследования и обсуждение. Наличие кист, в первую очередь в печени, является подозрением на Э и визуализация здесь незаменима. Для абдоминальных локализаций кист ультразвуковое исследование, конечно, останется методом выбора, однако КТ и МРТ не только расширяют доступные для визуализации места расположения кист паразита, но уточняют их особенности. КТ имеет неоспоримые преимущества перед другими способами визуализации для определения кальциноза паразитарных образований, в том числе в динамике в процессе консервативного лечения [8].

Примером может служить тотальная кальцификация эхинококковой кисты печени у пациента (рисунок 1), которая была расценена как показание для наблюдения и контроля без вмешательства. Полная кальцификация кисты свидетельствует о гибели личинки.

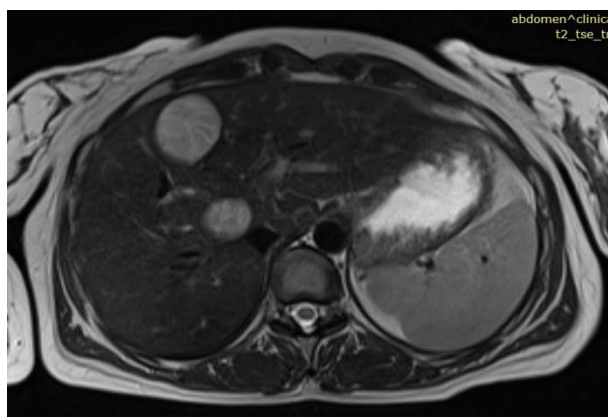
Что касается МРТ, то этот метод позволяет визуализировать кисты в нескольких проекциях, выявлять вовлечение в патологический процесс билиарного дерева, нарушения целостности и флотации внутренней оболочки паразитарной кисты, наличие дочерних кист [9].



Участок кальцификации в форме шара в правой доле печени, видна неоднородность скоплений кальция в центре образования

Рисунок 1. — Абдоминальная нативная КТ пациента с погибшей кистой Э

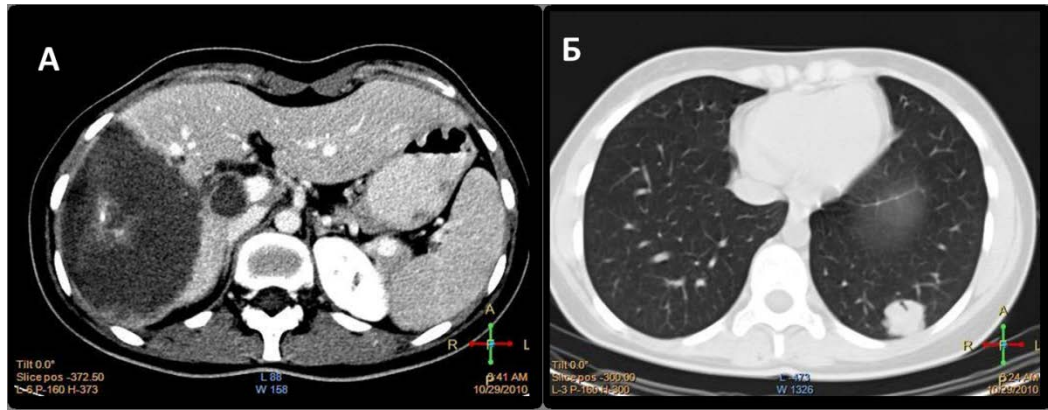
МРТ хорошо показывает жизнеспособные жидкостные эхинококковые кисты, как на рисунке 2. Видно, что одна из кист расположена в области ворот печени, что привело к оперативному лечению с послеоперационной противорецидивной терапией альбендазолом.



Две кисты округлой формы в правой доле печени, меньшая расположена вблизи ворот печени

Рисунок 2. — Абдоминальная нативная МРТ (T2–взвешенный режим, аксиальная проекция) пациентки с активными кистами Э

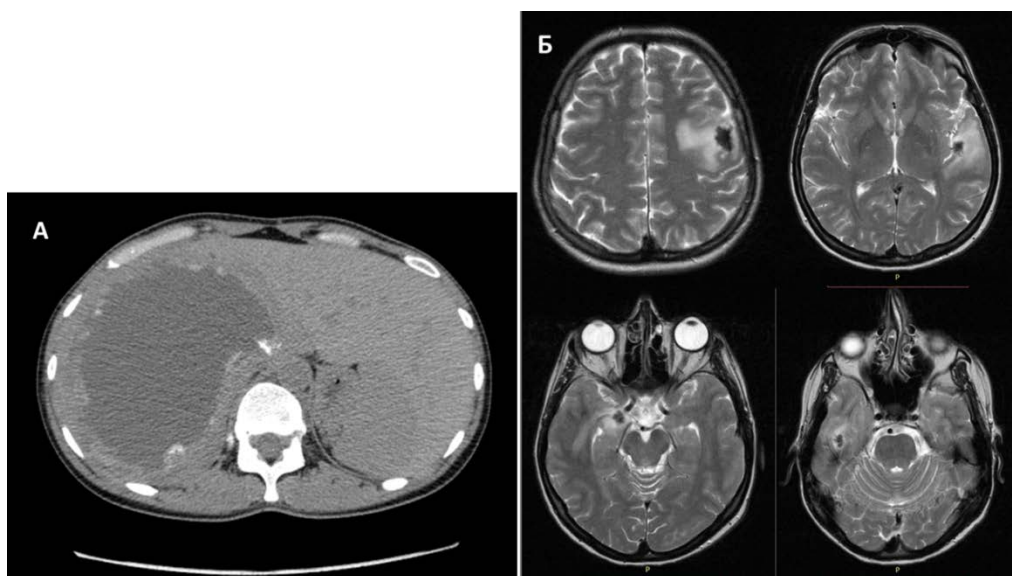
Важнейшим достоинством КТ и МРТ является то, что они дают возможность объективно судить о размерах кист, их количестве и расположении, взаимоотношении с сосудами, протоками, бронхами и пр., оценивать стадию развития паразита, выявлять поражение личинкой других органов. Эти данные имеют решающее значение при определении хирургического доступа, планировании вида операции, ее объема, предположения возможных интраоперационных осложнений. Примером сложного оперативного подхода может служить случай альвеококкоза печени с метастазом в легкие (визуализация представлена на рисунке 3). Пациентка была последовательно подвергнута хирургическому вмешательству на легких и затем была произведена правосторонняя гемигепатэктомия.



А — в правой доле печени крупный очаг поражения в артериальную фазу контрастирования с центральным распадом и кальцинозом, второй меньший очаг в воротах печени
 Б — участок поражения пристеночно в левом легком

Рисунок 3. — Абдоминальная и грудная КТ пациентки с альвеококкозом и метастазом в левое легкое

Внепеченочная локализация метастатических поражений при альвеококкозе требует выполнения протокола визуализации у таких пациентов с выполнением МРТ или КТ не только органов грудной клетки, но и головного мозга. К сожалению, метастазы альвеококка в ЦНС являются неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов даже на постоянной терапии альбендазолом. На рисунке 4 приводятся результаты визуализации первичного альвеококка в печени (нативная КТ) и МРТ головного мозга пациентки с четырьмя очагово-воспалительными участками — метастазами паразита.



А — первичный альвеококковый очаг в печени большого размера с очаговым периферическим кальцинозом, викарное увеличение левой доли печени
 Б — МРТ, T2–взвешенное изображение, аксиальная проекция, очаги с перифокальным отеком в правой височной, левой теменной и височной областях

Рисунок 4. — Абдоминальная нативная КТ и МРТ головного мозга (T2–взвешенный режим) пациентки с альвеококкозом и метастазами в головной мозг

Заключение. Внедрение в практику высокоинформативных методов визуализации позволяет значительно улучшить диагностику эхинококкоза, особенно его ранних форм, что дает возможность применять консервативную терапию, чаще производить радикальные и, в то же время, экономные оперативные вмешательства.

Современные подходы к лечению Э основаны на рекомендациях Неофициальной рабочей группы ВОЗ по эхинококкозу (2010) и имеют четыре направления в зависимости от размеров и локализации кист: (1) консервативная терапия бензимидазолами (альбендазол, мебендазол); (2) малоинвазивное чрезкожное вмешательство для стерилизации кисты; (3) оперативное удаление кисты; (4) наблюдение и контроль без вмешательства [6].

Для лечения А рекомендуется после радикального удаления паразита из печени применение бензимидазолов в течение 2-х лет под контролем; при неоперабельном поражении или наличии отдаленных метастазов — пожизненный прием антигельминтиков; трансплантация печени с пожизненной химиотерапией под наблюдением специалистов [6].

Ожидается презентация новых рекомендаций рабочей группы ВОЗ на 27-м международном конгрессе по эхинококкозу (4–7 октября 2017 г., Алжир), возможно, будут внесены изменения.

Для конкретного пациента должен подбираться индивидуальный вариант лечения с продолжительным периодом наблюдения и контроля. Практика показала необходимость создания мультидисциплинарной команды специалистов по эхинококкозам человека для лучшего контроля, сбора, хранения материалов и информации с целью улучшения протоколов лечения. В Европе уже работает и оказывает помощь по сбору и переработке информации Европейский Регистр Цистного Эхинококкоза [10].

В Республике Беларусь имеются предпосылки, включая материальную базу визуализации, для создания Национального центра и регистра эхинококкозов.

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. — Центр СМИ. — Эхинококкоз. — Информационный бюллетень. — Март 2017. — Режим доступа : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs377/ru/>. — Дата доступа : 20.09.2017.
2. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 11 Foodborne parasitic diseases, 2010: a data synthesis / P. R. Torgerson [et al.] // PLoS Med. — 2015. — Vol. 12. — e1001920.
3. Vuitton, D. A. *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite-host interplay / D. A. Vuitton, B. Gottstein // J. Biomed. Biotechnol. — 2010. — 923193.
4. Kern, P. Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis / P. Kern // Curr. Opin. Infect. Dis. — 2010. — Vol. 23. — P. 505–512.
5. Surgical treatment for hepatic alveolar echinococcosis: report of 50 cases / A. Ayifuhan [et al.] // Hepatogastroenterology. — 2012. — Vol. 59. — P. 790–793.
6. Brunetti, E. Writing Panel for the WHO-IWGE, 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans / E. Brunetti, P. Kern, D. A. Vuitton // Acta Trop. — Vol. 114. — P. 1–16.
7. Котляров, П. М. Современная лучевая диагностика заболеваний легких / П. М. Котляров // Качество жизни. Медицина. — 2004. — № 1. — С. 47–50.
8. Diagnosing and staging of cystic echinococcosis: how do CT and MRI perform in comparison to ultrasound? / M. Stojkovic [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. — 2012. — Vol. 6. — e1880.
9. Multidisciplinary imaging of liver hydatidosis / G. Marrone [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2012. — Vol. 18. — P. 1438–1447.
10. The Italian registry of cystic echinococcosis (RIEC): the first prospective registry with a European future / F. Tamarozzi [et al.] // EuroSurveill. — 2015. — Vol. 20. — pii:21115.

MODERN METHOD OF IMAGING IN THE DIAGNOSIS OF HUMAN LARVAL HELMINTHOSIS IN HUMAN (ECHINOCOCCOSIS AND ALVEOCOCCOSIS)

Ivanova M.A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The echinococcoses are chronic, parasitic diseases that are acquired after ingestion of infective taeniid tapeworm eggs from certain species of the genus *Echinococcus*. Clinical manifestations and disease courses vary profoundly for the different species of *Echinococcus*. MRI allows the visualization of cysts in multiple planes, CT is actually the method of choice to study extrahepatic dissemination of cysts. The echinococcoses are often expensive and complicated to treat, and prospective clinical studies are needed to better inform case management decisions.

Keywords: echinococcosis, alveococcosis, visualization, magnetic resonance imaging, computed tomography.

Поступила 18.09.2017

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

*Т.Н. Касницкая¹, Е.П. Счеслёнок¹, П.А. Семижон¹, Н.А. Дубков¹, С.А. Бусел²,
Е.В. Федорович², А.С. Владыко¹*

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

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

Резюме. С использованием бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования охарактеризовано 11 изолятов *Yersinia enterocolitica*, выделенных из объектов окружающей среды (смывы с овощей и оборудования плодоовощехранилищ). Подтверждена их видовая принадлежность и определен серотип с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции. Установлена принадлежность 7 изолятов к серотипу O:8, 2 — к серотипу O:5,27, для 2 изолятов серотип не установлен.

Ключевые слова: кишечный иерсиниоз, *Yersinia enterocolitica*, полимеразная цепная реакция, объекты окружающей среды.

Введение. *Yersinia enterocolitica* является возбудителем кишечного иерсиниоза — зооантропонозной инфекции. Резервуаром возбудителя в природе являются мелкие грызуны. Они обсеменяют различные объекты внешней среды, почву, пищевые продукты, воду, способствуя распространению инфекции среди диких и домашних животных, а также мелких певчих птиц. Источником инфекции для человека являются в основном домашние животные и мелкие грызуны. Ведущий путь передачи — алиментарный. Главными факторами передачи являются мясные продукты, овощи, корнеплоды, молоко, вода. Особенностью кишечных иерсиний является их способность размножаться в пищевых продуктах, хранящихся в холодильниках. Чаще встречаются спорадические случаи заболеваний, но возможны семейные групповые заболевания

и эпидемии в коллективах с централизованным питанием. Заболевание характеризуется лихорадкой, преимущественным поражением пищеварительного тракта с тенденцией к генерализованному поражению различных органов и систем, токсико-аллергическими проявлениями, разнообразием клинических форм. Инфекцию у человека в основном вызывают серотипы O:3, O:5,27, O:8 и O:9 *Yersinia enterocolitica* [1, 2].

Изменение биологических свойств возбудителей кишечного иерсиниоза в процессе циркуляции, снижение доли ранее доминирующих серотипов и выявление новых серо-биотипов [3] способствуют активизации проведения микробиологического мониторинга циркуляции бактерий в различных объектах окружающей среды с использованием молекулярно-биологических методов исследования с целью получения современных знаний о возбудителе.

Цель работы — изучение молекулярно-генетических и биохимических характеристик изолятов *Y. enterocolitica*, выделенных из объектов окружающей среды на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы. В работе использованы 11 изолятов, выделенных из объектов окружающей среды (таблица 1).

Таблица 1. — Общие сведения об изолятах, выделенных из объектов окружающей среды

№ п/п	№ пробы	Объект выделения	Организация, проводившая выделение изолятов	Предварительная идентификация
1.	343/2	смыв со свеклы	Лаборатория диагностики ООИ ГУ «РЦГЭиОЗ»	<i>Yersinia enterocolitica</i>
2.	344/11	смыв с тары для хранения овощей	-/-	-/-
3.	346/7	смыв с моркови	-/-	-/-
4.	969	смыв с капусты	-/-	-/-
5.	972	смыв с моркови	-/-	-/-
6.	973	смыв со свеклы	-/-	-/-
7.	1173	смыв с ножа	-/-	-/-
8.	1174	смыв с капусты	-/-	-/-
9.	1175	смыв с яблок	-/-	-/-
10.	1177	смыв с пола	-/-	-/-
11.	524	смыв со свеклы	Лаборатория диагностики ООИ ГУ «Витебский ОЦГЭиОЗ»	-/-

Бактериальные культуры, выращенные на агаровых сколах, культивировали при 26°C на жидких питательных средах LB и MacConkey. Дифференцирующий агар для иерсиний (ЦИН-агар) использовали для получения отдельных колоний бактерий с целью последующего накопления и оценки биохимических свойств культуры.

Для оценки биохимических свойств бактериальных штаммов использовали тест-систему «API 20 E», фирмы «bioMérieux», Франция.

Для выделения бактериальной ДНК из изолятов *Y. enterocolitica* использовали набор реагентов «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс», Российская Федерация. Все манипуляции проводились согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Для постановки мультиплексной полимеразной цепной реакции с целью O-генотипирования *Y. enterocolitica* осуществляли выделение геномной ДНК

из изолированных колоний, используя метод кипячения [4]. Для выделения использовали одну изолированную колонию, которую инокулировали в 50 мкл 25 мМ раствора NaOH. Полученную смесь прогревали при 100°C в течение 10 мин, после чего добавляли к смеси 50 мкл 80 мМ Tris/HCl буфера (pH 7,5) для нейтрализации действия щелочи. Центрифугировали полученную смесь при 20000 g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант переносили в новую 1,5 мл пробирку, 1 мкл использовали для постановки ПЦР.

Диагностическая тест-система для выявления ДНК *Y. pseudotuberculosis*/*Y. enterocolitica* «Белар-*Y.ps./Y.ent.*-ПЦР/РВ», Республика Беларусь, была использована для выявления ДНК возбудителей иерсиниозов методом ПЦР в режиме «реального времени». Все манипуляции проводились согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Анализ нуклеотидной последовательности участка гена *gyrB* методом секвенирования использовали для подтверждения видовой принадлежности изолятов. Для выявления гена *gyrB* использовали пары праймеров: YgirF — 5'-GTATTAAGGGCTGGATGC-3', YgirR — 5'-TTTATCTTTGGTCTGTDAGGAG-3', длина продукта амплификации — 900 п.о. [5]. Для проведения ПЦР был использован прибор IQ5 (Bio-Rad, США), программа: 1 цикл 95°C — 5 мин; 35 циклов: 94°C — 20 сек, 55°C — 20 сек, 72°C — 40 сек.

Аmplифицированные фрагменты ДНК анализировали в 2 % агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 В/см геля в ТРИС-ацетатном буфере, pH 8,0. ДНК визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ-свете на трансиллюминаторе.

Секвенирование фрагментов гена *gyrB* проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США) согласно прилагаемой инструкции. Очистку фрагментов ДНК проводили с использованием набора «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen, США). Электрофорез и анализ продуктов реакции осуществляли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Clustal X, GenDoc, MEGA 4.0.

Для анализа нуклеотидных последовательностей геномов возбудителей, вызывающих кишечный иерсиниоз, использовали программы Mega 4.0, Blast (N и X), Lasergene DNASTar (подпрограммы EditSeq, MegAlign, SeqMan), ClustalX и др.

В качестве альтернативы существующему традиционному методу серотипирования была применена мультиплексная ПЦР для O-генотипирования *Y. enterocolitica* с использованием праймеров:

per_FW- 5'- TCCTTCTCCAAATATATAGGTGCCA-3'	}	O:9
per_RV - 5'- ATGCGGCATTAGATGAGATGGA-3'		
wzt_FW- 5'- GTTAGTTCCTGCATCTGATCGCC-3'	}	O:5,27
wzt_RV - 5'- ATCCAGCATCCATGGCTCC-3'		
wbbU_FW - 5'- ACCTCGTATTTTGAAGATGATCGC-3'	}	O:3
wbbU_RV - 5'- GТАCTCAATAACTTGCTGTTTCGGA-3'		
wbcA_FW - 5'- TGATGAACGAGGCGAGTTTGT-3'	}	O:8
wbcA_RV- 5'- ТАCTCCGTCTGTTATGCGGATTTA-3'		

Режим амплификации: 1 цикл 95°C — 5 мин; 35 циклов: 94°C — 40 сек, 58°C — 40 сек, 72°C — 60 сек.; 1 цикл 72°C — 8 мин.

Аmplифицированные фрагменты ДНК анализировали в 2 % агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 В/см геля в ТРИС-ацетатном буфере, рН 8,0. ДНК визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ-свете на трансиллюминаторе.

Результаты и их обсуждение. Особенности культивирования, оценку биохимических свойств и подтверждение видовой специфичности изолятов *Y. enterocolitica* определяли с использованием бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования.

В результате проведенных исследований изоляты *Y. enterocolitica* были восстановлены на дифференцирующей питательной среде МакКонки и высеяны в разведениях от 10^{-5} до 10^{-7} на твердую питательную среду (ЦИН-агар). После инкубации при 26°C в течении 24 ч анализируемые изоляты бактерий образовывали на твердой питательной среде колонии, типичные для бактерий рода *Yersinia*: выпуклые прозрачные колонии малинового цвета с темно-розовым четко отграниченным центром и прозрачным бесцветным краем («бычий глаз»), диаметром 1–1,5 мм и имели гладкую блестящую поверхность, ровные края и маслянистую консистенцию (рисунок 1).

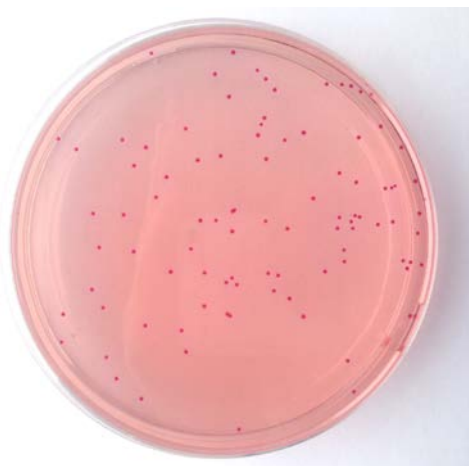
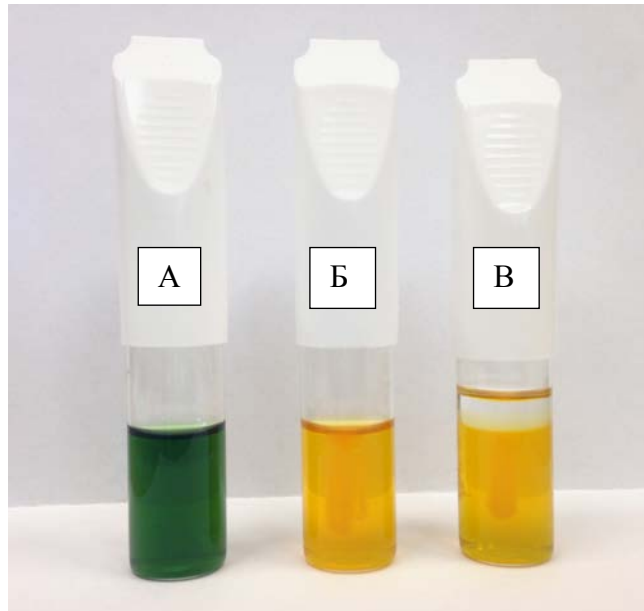


Рисунок 1. — Рост на ЦИН-агаре изолята *Yersinia enterocolitica* 346/7 после 24 ч инкубации при 26°C (в разведении 10^{-6})

Для оценки биохимических свойств изолятов использовали тест-систему «API 20E», фирмы bioMérieux, Франция. В результате все анализируемые изоляты при тестировании имели одинаковые показатели по биохимическим свойствам: имели β-галактозидазу, не имели аргининдегидролазы, лизиндекарбоксилазы, триптофандеаминазы, желатиназы, имели орнитиндекарбоксилазу, не утилизировали цитрат Симмонса, не образовывали сероводород, обладали уреазной активностью, не продуцировали индол, ферментировали и окисляли D-глюкозу, D-маннит, инозит, D-сорбит, D-сахарозу, амигдалин, L-арабинозу, не ферментировали L-рамнозу, мелибиозу, не обладали цитохромоксидазой, редуцировали нитраты, были подвижны при 26°C и неподвижны при 37°C, на среде Хью-Лейфсона окисляли и ферментировали глюкозу с образованием кислоты, реакция Фогес-Проскауэра (образование ацетоина) отрицательная при температуре 26°C, утилизировали эскулин (рисунки 2–5).

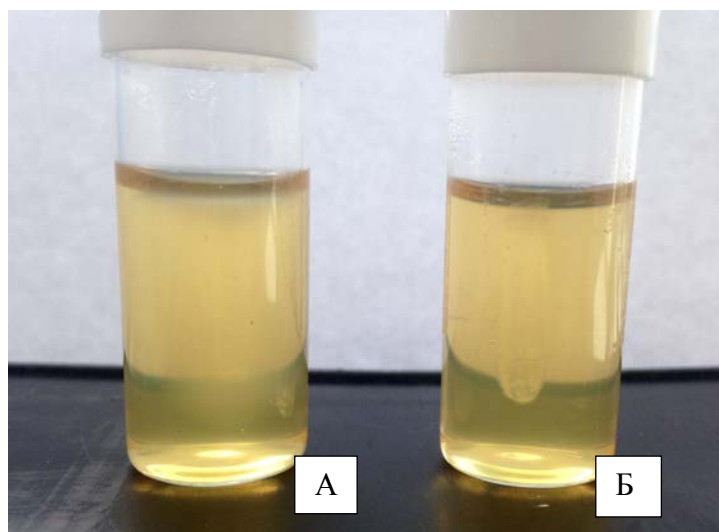


Рисунок 2. — Идентификация изолята *Yersinia enterocolitica* 346/7 по биохимическим свойствам



А — исходная среда; Б — окисление глюкозы с образованием кислоты; В — ферментация глюкозы с образованием кислоты

Рисунок 3. — Рост на среде Хью-Лейфсона изолята *Y. enterocolitica* 346/7 после 24 ч инкубации при 26°C



А — подвижность при 26°C, Б — подвижность при 37°C

Рисунок 4. — Подвижность изолята *Y. enterocolitica* 346/7 после 24 ч инкубации

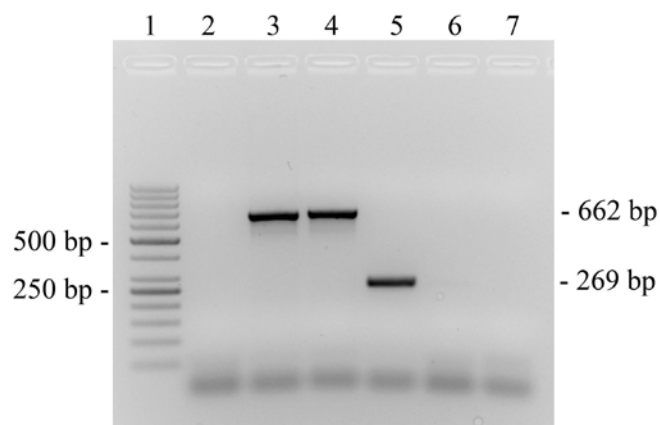


А — исходная среда, Б — гидролиз эскулина

Рисунок 5. — Постановка эскулинового теста с изолятом *Y. enterocolitica* 346/7 после 24 ч инкубации при 26°C

Анализ ДНК, выделенных из бактериальной культуры изолятов, методом ПЦР в режиме «реального времени» с использованием дифференцирующей тест-системы «Белар-*Y.ps./Y.ent.*-ПЦР/РВ» выявил наличие ДНК *Y. enterocolitica* во всех пробах.

Метод мультиплексной ПЦР использовали для проведения серо-генотипирования иерсиний на основе генетической организации O-аg геномных кластеров серотипов *Y. enterocolitica*, патогенных для человека (O:8, O:3, O:9, O:5,27, O:5) [4]. Анализ изолятов *Y. enterocolitica*, выделенных из объектов окружающей среды, с использованием мультиплексной ПЦР 4-мя парами праймеров к различным областям O-аg геномных кластеров *Y. enterocolitica* (*per*, *wzt*, *wbbU*, *wbcA*) выявил в 7 образцах изолятов *Y. enterocolitica* серотип O:8, в 2 образцах — серотип O:5,27, для 2 изолятов серотип установить не удалось. На рисунке 6 представлены результаты электрофоретического анализа фрагментов ДНК, амплифицированных на матрице ДНК изолятов №№ 343/2, 344/11 и 346/7, с использованием праймеров к областям O-аg геномных кластеров *Y. enterocolitica* (рисунок 6).



Дорожки: 1 — GeneRuler 50 bp DNA ladder; 3, 4 — ПЦР-продукты, полученные на матрице ДНК *Y. enterocolitica* №№ 343/2 и 344/11 (серотип O:5,27, размер фрагмента 662 п.о.), соответственно; 5 — ПЦР-продукт, полученный на матрице ДНК *Y. enterocolitica* № 346/7 (серотип O:8, размер фрагмента 269 п.о.); 6 — результат ПЦР на матрице ДНК *Y. enterocolitica* № 524

Рисунок 6. — Электрофоретический анализ продуктов амплификации, полученных в мультиплексной ПЦР

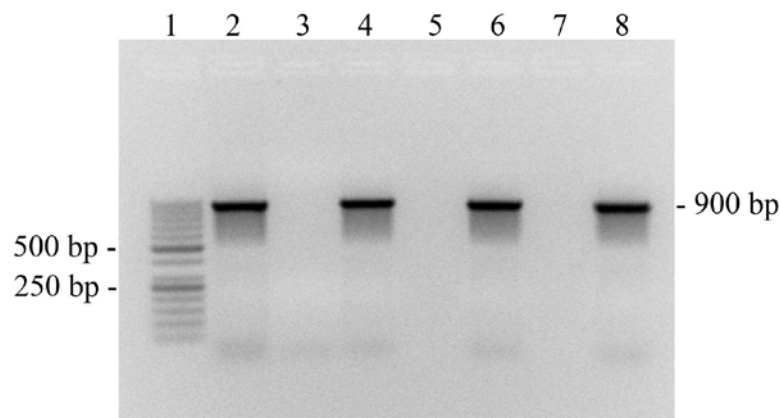
Из рисунка видно, что на матрице ДНК изолятов №№ 343/2, 344/11 синтезировался ДНК фрагмент размером 662 п.о., соответствующий выбранной области геномного кластера *wbcA* серотипа O:5,27. Фрагмент ДНК размером 269 п.о., амплифицированный на матрице ДНК изолята №346/7, соответствовал области *wzt* серотипа O:8.

Результаты биохимической идентификации и O-генотипирования изолятов *Y. enterocolitica* приведены в таблице 2.

Таблица 2. — Характеристика изолятов *Y. enterocolitica*, выделенных их объектов окружающей среды

№ п/п	№ пробы	Объект выделения	Индекс идентификации <i>Y. enterocolitica</i>	Серо-генотип
1.	343/2	смыв со свеклы	111472317	O:5,27
2.	344/11	смыв с тары для хранения овощей	-/-	O:5,27
3.	346/7	смыв с моркови	-/-	O:8
4.	524	смыв со свеклы		н/у
5.	969	смыв с капусты	-/-	O:8
6.	972	смыв с моркови	-/-	O:8
7.	973	смыв со свеклы	-/-	O:8
8.	1173	смыв с ножа	-/-	н/у
9.	1174	смыв с капусты	-/-	O:8
10.	1175	смыв с яблок	-/-	O:8
11.	1177	смыв с пола	-/-	O:8

Анализ нуклеотидной последовательности участка гена *gyrB*, кодирующего В-субъединицу ДНК-гиразы, использовали для подтверждения видовой принадлежности изолятов. С использованием пары праймеров Ygir R и Ygir F были амплифицированы ДНК-фрагменты размером 900 п.о. на матрице ДНК трех изолятов №№343/2, 344/11, 346/7, которые после предварительной очистки были взяты в реакцию секвенирования (рисунок 7).



Дорожки: 1 — ДНК маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder; 2, 4, 6, 8 — ДНК-фрагмент, амплифицированный на матрице ДНК штамма *Y. enterocolitica* 345 (положительный контроль) и изолятов №№ 343/2, 344/11, 346/7, соответственно

Рисунок 7. — Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Последовательности анализировали с использованием программы MEGA v.4.0. В результате было установлено, что анализируемые нуклеотидные последовательности участков гена *gyrB* изолятов *Y. enterocolitica* 343/2, 344/11 и 346/7 совпадают на 99–100 % с аналогичными последовательностями *Y. enterocolitica*, представленными в международной базе данных GenBank: штамм FORC-002 (CP009456.1), штамм 8081 (CP009846.1), штамм WA (CP009367.1), штамм YE1 (CP016945.1) (таблица 3).

Таблица 3. — Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* изолятов *Y. enterocolitica* 343/2, 344/11 и 346/7

343–F (818 N)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Yersinia enterocolitica strain FORC-002, complete genome	1507	1507	99 %	0.0	100 %	CP009456.1
Yersinia enterocolitica strain 8081, complete genome	1474	1474	99 %	0.0	99 %	CP009846.1
Yersinia enterocolitica strain WA, complete genome	1474	1474	99 %	0.0	99 %	CP009367.1
Yersinia enterocolitica strain YE1, complete genome	1452	1452	99 %	0.0	99 %	CP016945.1

344–F (833 N)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Yersinia enterocolitica strain FORC-002, complete genome	1530	1530	99 %	0.0	99 %	CP009456.1
Yersinia enterocolitica strain 8081, complete genome	1485	1485	99 %	0.0	99 %	CP009846.1
Yersinia enterocolitica strain WA, complete genome	1485	1485	99 %	0.0	99 %	CP009367.1
Yersinia enterocolitica strain YE1, complete genome	1463	1463	99 %	0.0	99 %	CP016945.1

346–F (824 N)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Yersinia enterocolitica strain FORC-002, complete genome	1500	1500	99 %	0.0	99 %	CP009456.1
Yersinia enterocolitica strain 8081, complete genome	1461	1461	99 %	0.0	99 %	CP009846.1
Yersinia enterocolitica strain WA, complete genome	1461	1461	98 %	0.0	99 %	CP009367.1
Yersinia enterocolitica strain YE1, complete genome	1439	1439	98 %	0.0	99 %	CP016945.1

Заключение. В работе дана молекулярно-генетическая и биохимическая характеристика изолятов *Y. enterocolitica*, подтверждающая их видовую принадлежность. Использование тест-системы «API 20E» позволило идентифицировать все изоляты *Y. enterocolitica* с точностью 99,8 %. Метод мультиплексной ПЦР, который был использован для проведения серогенотипирования иерсиний на основе генетической организации O-аg геномных кластеров, позволил выявить в 7 образцах изолятов *Y. enterocolitica* серотип O:8, в 2 образцах — серотип O:5,27. Секвенирование нуклеотидной последовательности участков генов *gyrB* изолятов выявило совпадение на 99–100 % с аналогичными последовательностями штаммов *Y. enterocolitica*, представленными в базе данных GenBank.

Изоляты *Y. enterocolitica* 343, *Y. enterocolitica* 344, *Y. enterocolitica* 346 депонированы в Специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, и в дальнейшем могут быть использованы в качестве референс-штаммов при сравнительном изучении изолятов *Y. enterocolitica*, циркулирующих на территории республики.

Авторы выражают благодарность д-ру мед. наук, профессору В.Ф. Еремину за техническую помощь по секвенированию нуклеотидной последовательности участка гена *gyrB*.

Литература

1. Иерсинии и иерсиниозы / под ред. Г. Я. Ценовой. — СПб., 2006. — С. 21, 143.
2. Ценева, Г. Я. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний / Г. Я. Ценева, Н. Ю. Солодовникова, Е. А. Воскресенская // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2002. — № 3. — С. 248–266.
3. Молекулярно-биологические методы идентификации иерсиний, циркулирующих на территории Якутии / О. Н. Софронова [и др.] // Дальневосточный журн. инфекц. патол. — 2012. — № 20. — С. 77–83.

4. A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis / D. Garzetti [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. — 2013. — Vol. 304. — P. 275–283.

5. The molecular phylogeny of *gyrB* gene: a molecular marker for systemic of *Yersinia* / A. M. Stenkova [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. — 2012. — Vol. 954. — P. 53–56.

CHARACTERISTICS OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ISOLATES TAKEN FROM THE ENVIRONMENT OBJECTS IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

*T.N. Kasnitskaya¹, E.P. Scheslenok¹, P.A. Semizhon¹, N.A. Dubkov¹, S.A. Buse²,
E.V. Fedorovich², A.S. Vladyko¹*

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;

²Republican Center for Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus

Using bacteriological, biochemical and molecular genetic methods of investigation, 11 isolates of *Yersinia enterocolitica* taken from the environmental objects (patterns from vegetables and equipment of vegetable storage) were characterized. Their species affiliation was confirmed and a serotype was identified using a multiplex polymerase chain reaction. The presence of 7 isolates to serotype O:8, 2 — to serotype O:5,27 was established, for 2 isolates the serotype was not established.

Keywords: intestinal yersiniosis, *Yersinia enterocolitica*, polymerase chain reaction, environmental objects.

Поступила 17.08.2017

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

*Н.Д. Коломиец¹, О.В. Тонко¹, Н.Н. Левшина², С.С. Филипенко³, Е.В. Федорович³,
Н.В. Дудчик⁴, С.Б. Войтик⁵, А.Г. Красько⁶, В.В. Гулин³,
И.Н. Глинская³, Л.К. Наройчик³*

¹ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;

²ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»;

³ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»;

⁴РУП «Научно-практический центр гигиены»;

⁵ГУ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»;

⁶ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь

Резюме. Подготовлена концепция развития микробиологической диагностики в Республике Беларусь целью которой является совершенствование структуры и функций микробиологических лабораторий учреждений здравоохранения, повышение эффективности клинических исследований и санитарных микробиологических испытаний, направленное на улучшение качества оказания медицинской помощи населению и совершенствование государственного санитарного надзора в Республике Беларусь.

Ключевые слова: микробиологические исследования, концепция, аккредитация, лабораторное обеспечение, сличительные испытания

Введение. Микробиология — наука о микроорганизмах, ее разделами являются бактериология, вирусология, микология, паразитология. Поэтому вполне понятна ее возрастающая роль для медицины в решении научных и прикладных проблем, что обусловлено убиквитарным распространением микроорганизмов, появлением новых (эмерджентных) или интенсивно эволюционирующих уже известных патогенов, представляющих реальные риски для различных групп населения [1].

Глобальные изменения в экологии и антропогенная трансформация внешней среды способствовали не только формированию новых природных очагов инфекций, но и спровоцировали изменения в естественном круговороте потенциально опасных для человека патогенов. В этих условиях среди микропопуляций людей, животных и совокупности объектов среды обитания отмечается увеличение уровня вирулентности и формирование устойчивых микробных сообществ. Еще одной важной особенностью является широкое, но не всегда рациональное использование в клинике и ветеринарной практике антимикробных препаратов, что привело к появлению и селекции резистентных и полирезистентных штаммов возбудителей, в том числе патогенных и условно-патогенных. Сегодня значительно облегчается отбор и формирование в популяциях микроорганизмов высокоспециализированных и контагиозных эпидемических вариантов, устойчивых к воздействию антибиотиков и дезинфектантов и легко формирующих биопленки. Ежегодно неуклонно возрастает количество резистентных форм микроорганизмов, распространение которых может сопровождаться большими человеческими и экономическими потерями инфекциями случаев заболеваний и смертельных исходов [2, 3].

На современном этапе, с учетом глобализации торговли, развитие интеграционных процессов и расширение торгово-экономического сотрудничества между странами устранили привычные территориальные и экономические барьеры и позволили микроорганизмам выйти за пределы хорошо известных эндемичных территорий. По данным ВОЗ продолжает расширяться список стран, вовлеченных в эпидемии и пандемии, вызванные опасными микроорганизмами [3].

Вышеизложенная информация диктует необходимость обеспечения надлежащих условий для получения достоверных и репрезентативных результатов микробиологических диагностических исследований/ испытаний в области клинической и санитарной микробиологии, которые должны выполняться в соответствии с требованиями доказательной медицины и современных систем управления (менеджмента) качества.

Объективные процессы реформирования здравоохранения и санитарно-эпидемиологической службы в стране и назревшая необходимость внедрение новых медицинских технологий в диагностику, лечение и защиту от инфицирования населения требуют от профильных специалистов разного уровня и руководителей четкое понимание планируемых задач, как для клинической, так и санитарной микробиологии.

Направление диагностических исследований в Республике Беларусь претерпело существенные изменения. Произошла реорганизация сети микробиологических лабораторий за счет сокращения их количества и создания центров коллективного пользования. С одной стороны это позволило оснастить лаборатории современным аналитическим оборудованием и оптимизировать количество и стоимость исследований, а с другой стороны показало необходимость применения индивидуальных решений, особенно в тех случаях, когда быстрая доставка материала

на исследование и своевременное получение результатов исследований оказалось невозможным [4].

Цель концепции — совершенствование структуры и функций микробиологических лабораторий учреждений здравоохранения, повышение эффективности клинических исследований и санитарных микробиологических испытаний, направленное на улучшение качества оказания медицинской помощи населению и совершенствование государственного санитарного надзора в Республике Беларусь.

Текущее состояние. Микробиологические исследования в Республике Беларусь выполняют 224 лаборатории, в том числе 127 лабораторий центров гигиены и эпидемиологии и 97 лабораторий лечебно-профилактических учреждений, а также государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (РНПЦЭиМ) и республиканском унитарном предприятии "Научно-практический центр гигиены" (РНПЦГ) и других республиканских научно-практических центрах.

На современном этапе в организационной структуре учреждений государственного санитарного надзора и здравоохранения осуществляющих работу с патогенными биологическими агентами (ПБА) и условно-патогенными микроорганизмами (УПМ), выделяют четыре основных уровня:

I — районный (городской) — лаборатории районных и городских центров гигиены и эпидемиологии (ЦГЭ) и учреждений здравоохранения (УЗ);

II — зональный — лаборатории зональных ЦГЭ; крупные лаборатории УЗ;

III — областной — лаборатории областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ОЦГЭиОЗ), государственного учреждения «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» (МГЦГЭ), лаборатории профильных республиканских научно-практических центров;

IV — республиканский — лаборатории государственного учреждения ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (РЦГЭиОЗ), РНПЦЭиМ и РНПЦГ.

Их деятельность по клинической диагностике и исследований в рамках государственного санитарного надзора в учреждениях здравоохранения и учреждениях санитарно-эпидемиологической службы строится на принципах:

— территориальной организации обеспечения населения;

— взаимосвязи и взаимодействия учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор и надзорными организациями иных органов государственного управления и ведомств;

— дифференциации этапов, объема и методов исследования материала в соответствии с уровнем организации лабораторной базы и соблюдением преемственности;

— единства и унификации методов отбора и транспортирования материала, схем исследования и регламентированных методов диагностики;

— единства требований биологической безопасности при отборе, хранении, транспортировании и исследовании материала, подозрительного на содержание патогенных микроорганизмов.

Клинические микробиологические исследования осуществляют: лаборатории, находящиеся в составе УЗ как самостоятельные структурные (в том числе, многопрофильные) подразделения или отделения и функциональные группы в составе в составе клиничко-диагностических лабораторий (КДЛ) и лаборатории, входящие в состав ЦГЭ, РНПЦ. Объем и порядок проведения диагностических исследований по обнаружению ПБА и УПМ регламентированы соответствующими

для каждого вида возбудителя нормативно-методическими документами. Функции таких лабораторий заключаются в проведении микробиологических исследований связанных с определением в биологических образцах микроорганизмов, их резистентности к антимикробным и химиотерапевтическим препаратам; определением антител, антигенов и нуклеиновых кислот ПБА и УПМ; контролем объектов окружающей среды в УЗ.

Санитарно-микробиологические исследования осуществляют: лаборатории, находящиеся в составе центров гигиены и эпидемиологии. Номенклатура и объем исследований определяются уровнем, оснащенностью лабораторий, областью аккредитации.

В этом случае, функциями лабораторий являются контроль микробиологической безопасности пищевых продуктов, продовольственного сырья, воды и мониторинг содержащихся в среде обитания человека микроорганизмов, способных непосредственно или косвенно неблагоприятно влиять на здоровье людей.

Для обеспечения биологической безопасности лаборатории должны иметь разрешение на осуществление работ с УПМ и ПБА I-II групп риска (для зонального уровня) или III-IV групп риска (для областного и республиканского уровней). При этом лаборатории, имеющие разрешение на работу с микроорганизмами УПМ и ПБА I-II групп риска, могут выполнять диагностические исследования на холеру и ботулинический токсин с целью профилактики этих инфекций, а также иммунологические (серологические) исследования по обнаружению в крови людей антигенов микроорганизмов III группы риска (без накопления возбудителя) и/или антител к ним [5].

Перспективы развития клинических микробиологических исследований. Главными задачами данного раздела по-прежнему определяют индикацию, идентификацию микроорганизма, подтверждение или опровержение его роли в развитии заболевания, изучение характеристик лежащих в основе рационального выбора адекватных химиотерапевтических препаратов, при условии максимально быстрого их назначения. Благодаря микробиологическим исследованиям можно также осуществлять мониторинг изменчивости свойств микроорганизмов, лежащий в основе лечения или предупреждения осложнений основного заболевания, организации локальных или масштабных профилактических мероприятий.

Актуальная потребность определила направление развития, и появились технологические решения, позволяющие принципиально сократить сроки получения клинически значимых результатов исследования с возможностью в течение 1–2 дней получить ответ о наличии возбудителя в исследуемом материале и его чувствительности к химиопрепаратам, а также определить механизмы множественной лекарственной устойчивости, организовать мониторинг распространения возбудителей.

С внедрением новых технологий назрел и новый концептуальный подход к клинической микробиологической диагностике. Сегодня для решения этих проблем на практике успешно используют достижения естественных наук, интенсивно применяет новые технологии диагностики и лечения заболеваний. В последнее несколько десятилетий к традиционным микробиологическим и иммунологическим методам лабораторной диагностики инфекционных заболеваний добавились новые, основанные на использовании молекулярно-генетических технологий.

При переходе от классических к современным методам исследований большое значение приобретает унификация самой процедуры их выполнения. Важную роль в этом процессе играют стандартизация методов, ускорение проведения анализов, улучшение воспроизводимости результатов, Необходимость переоснащения микробиологических лабораторий уже не вызывает сомнений. Требуется более

широкое внедрение в практику лабораторий новых технологий: молекулярно-биологических (амплификация и секвенирование), масс-спектрометрии и др., с обеспечением специфических для данных методов подходов к контролю качества.

Важнейшим направлением развития клинической лабораторной микробиологической диагностики является также стремление к сокращению расходов на лабораторную службу при повышении ее эффективности и качества диагностики. Такая цель может быть достигнута в результате обеспечения централизации и автоматизации лабораторных исследований; внедрении методов экспресс-диагностики; сокращении объема малоинформативных исследований; внедрении стандартных операционных процедур обеспечения и контроля качества, а также систем менеджмента качества в соответствии с требованиями международных стандартов; участии в межлабораторных сличениях различного уровня.

При расходовании ограниченных материальных ресурсов важно выделять приоритеты. Необходимо сохранить баланс в развитии материально-технической базы для классических и автоматизированных исследований. Хотя конкретные решения определяются особенностями учреждения (например, размер коечного фонда, специфика пациентов) приоритетным считают внедрение основанных на флуоресцентных технологиях, более ускоренных методов идентификации и оценки антибиотикочувствительности чистых культур микроорганизмов (например, MALDI-TOF) и молекулярно-биологических и иммунохроматографических методов диагностики. В частности, молекулярно-биологические методы повысят скорость обнаружения и идентификацию микроорганизмов, которые не культивируются или медленно растут в культуре. Эти методы также позволяют определить генотипы ПБА и идентифицировать гены, которые приводят к устойчивости к антибиотикам и другим антимикробным препаратам, правильно выбирать лечение и контролировать его ход, организовывать эпидемиологическое слежение за актуальными и социально-значимыми заболеваниями [6, 7].

Перспективы развитие санитарной микробиологии. В настоящее время развитие санитарной микробиологии также связано с внедрением вышеописанных технологий и характеризуется резким существенным повышением требований к качеству проведения испытаний, так как данный вид исследований проводится в аккредитованных в национальной системе аккредитации лабораториях. Эти требования регламентируют все элементы система качества в области проведения микробиологических испытаний, включая организационную структуру, управление документацией, устранение несоответствий, выбор методов и подтверждение их правильности (обоснованности). Проведение санитарно-микробиологических исследований экспортно ориентированной продукции должно быть организовано в полном соответствии с методами, предусмотренными законодательством ЕС и ЕАЭС и другими международными договорами.

Развитие и совершенствование системы обеспечения качества. Основные требования к системе качества испытательных лабораторий изложены в СТБ ИСО/МЭК 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» и СТБ ISO 15189 «Медицинские лаборатории. Требования к качеству и компетентности». 98 % микробиологических лабораторий ЦГЭ аккредитованы Белорусским государственным центром аккредитации на соответствие требований СТБ ИСО/МЭК 17025. К сожалению, ни одна из действующих лабораторий пока не аккредитована на соответствии с требованиями СТБ ISO 15189.

Вне зависимости от наличия статуса аккредитации в лаборатории, система обеспечения качества лабораторных исследований должна быть организована в любой,

даже небольшой лаборатории. На сегодняшний день микробиологические лаборатории демонстрируют достаточно высокий уровень в выполнении требований, предъявляемых к персоналу, помещениям, условиям окружающей среды, оборудованию, методикам испытаний и отчетной документации. Вместе с тем, существует ряд проблем в организации процедур контроля качества проводимых исследований.

Система обеспечения качества лабораторных исследований включает в себя внутрилабораторный контроль качества и внешнюю оценку качества, реализуемую путем участия лаборатории в программах проверок квалификации (межлабораторных сличений). Совершенствование данной работы состоит в применении критериев сравнения результатов внутрилабораторного контроля, для чего необходимо обучение специалистов приемам и методам статистической обработки результатов и единообразия в предоставлении результатов контроля. Это направление работы планируется реализовать в рамках проведения тренингов, организованных при проведении дней специалиста на базе ГУ РЦГЭиОЗ и при повышении квалификации на кафедре эпидемиологии и микробиологии БелМАПО.

В настоящее время имеются значительные проблемы в системе участия лабораторий в программах проверки квалификации путем участия лабораторий в межлабораторных сличительных испытаниях (далее — МСИ). Данная проблема связана с тем, что в стране отсутствуют провайдеры проверок квалификации в области проведения микробиологических исследований, а участие лабораторий в межлабораторных сличительных испытаниях международного уровня влечет за собой значительные экономические затраты.

В системе Министерства здравоохранения Республики Беларусь действуют лаборатории, обладающие высокой компетенцией и выполняющие референсные функции по определенным направлениям микробиологических исследований. Именно на базе таких учреждений должны быть организованы центры организации межлабораторных сличительных испытаний и координации работ по проверкам квалификации проводимых микробиологических исследований.

Совершенствование системы обеспечения лабораторным оборудованием и диагностическими изделиями медицинского назначения. Проведение Министерством здравоохранения Республики Беларусь централизованных закупок расходных материалов для диагностики инфекционных заболеваний и лабораторного обеспечения государственного санитарного надзора позволяет осуществлять непрерывность лабораторного процесса. Номенклатура приобретаемых диагностических изделий медицинского назначения (ДИМН) сегодня включает 350 наименований, что позволяет идентифицировать и определять маркеры порядка 180 видов микроорганизмов, используя культуральные, серологические и молекулярно-биологические методы.

Основной объем ДИМН (80–85 %) распределяется и расходуется для обеспечения диагностической потребности лабораторий УЗ, хотя микробиологический мониторинг являются важнейшей составляющей эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями.

На протяжении последних лет активно проводится работа по оптимизации номенклатуры закупаемых ДИМН.

Следует отметить, что в последние годы не проводилась государственная закупка оборудования для микробиологических лабораторий.

Научное сопровождение. В Законе «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» отмечается, что его обеспечение осуществляется путем подтверждения соответствия факторов среды обитания человека требованиям

законодательства в области санитарно-эпидемиологического благополучия; использования достижений науки в изучении состояния здоровья населения, среды обитания человека, использования и (или) разработки и утверждения соответствующих методов (методик) определения указанных факторов.

В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и НПЦ гигиены в рамках выполнения государственных и отраслевых программ научных исследований активно развивается научно-методическое обеспечение и разработка эффективных методов молекулярно-биологической диагностики и молекулярно-генетического анализа для решения актуальных эпидемиологических и санитарно-гигиенических задач. Для непосредственной связи с практическими лабораториями и участия в научном сопровождении лабораторной службы организаций государственного санитарно-противоэпидемического надзора на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии созданы и функционируют 9 референс-центров (лабораторий) по гриппу, полиомиелиту, ротавирусам, кори, краснухи, ВИЧ, гепатитам В, С, инвазивным бактериальным заболеваниям, кишечным вирусным инфекциям, санитарной вирусологии, по диагностике особо опасных, природно-очаговых и вновь возникающих инфекций, мониторингу резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов и Специализированной коллекции вирусов и бактерий патогенных для человека (национальное достояние Республики Беларусь под реестровым № 9). Сегодня фонд коллекции состоит из 246 наименований микроорганизмов, 502 единиц хранения.

Перспективой дальнейшего развития деятельности НПЦ гигиены и РНПЦ эпидемиологии и микробиологии является совершенствование технологий и методов применяемых в санитарной микробиологии, разработка всей линейки основных средств диагностических исследований и обеспечение потребности страны, совершенствование системы дозорного мониторинга за актуальными группами инфекций. Необходимо сосредоточить усилия на отработке унифицированного применения используемых методик; развивать научные исследования в области создания новых методов и способов диагностики ПБА и УПМ на основе перспективных технологий — геномики, протеомики, биочипы, секвенирование нового поколения, иммуногенетики, рекомбинантных биотехнологий и других.

Повышение уровня профессиональных знаний. Одной из важнейших долгосрочных задач кадровой политики в здравоохранении является организация и совершенствование системы последипломного обучения медицинских кадров в соответствии с постоянно возрастающими требованиями и запросами медицинской науки и практики. Послевузовская подготовка специалистов осуществляется на кафедре эпидемиологии и микробиологии в государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО).

Переподготовка проводится на основе общеобразовательных стандартов Республики Беларусь по специальностям 1–81 02 04 Бактериология (ОСРБ 1–81 02 04–2016), 1–81 02 06 Вирусология (ОСРБ 1–81 02 06–2016), 1–81 02 28 Паразитология (ОСРБ 1–81 02 28–2016). Требованием к уровню основного образования лиц, поступающих для освоения содержания образовательной программы является наличие высшего образования по специальностям: 1–79 01 03 «Медико-профилактическое дело»; 1–79 01 04 «Медико-диагностическое дело»; 1–79 01 01 «Лечебное дело»; 1–79 01 02 «Педиатрия»; 1–79 01 06 «Сестринское дело». Срок получения образования по специальности переподготовки составляет 4 месяца в очной (дневной) форме получения образования. Повышение квалификации проводится на основании Сводного плана повышения квалификации и переподготовки руководителей и специалистов, утверждаемого ежегодно Министром здравоохранения Республики Беларусь. Курс

обучения предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, врачей-вирусологов, врачей-лаборантов, лаборантов, биологов, микробиологов, научных сотрудников, преподавателей микробиологии учреждений образования системы здравоохранения.

Повышение квалификации и переподготовка фельдшеров-лаборантов и лаборантов проводится на базах государственных медицинских колледжей в соответствии с Планом образовательных программ повышения квалификации и переподготовки руководящих работников и специалистов со средним медицинским, фармацевтическим образованием, утвержденным Министерством Республики Беларусь.

Критерии оценки деятельности лабораторий. Лабораторная служба является существенным и основополагающим компонентом любой системы здравоохранения. Надежные и своевременные лабораторные анализы лежат в основе эффективного лечения пациентов. Кроме того, достоверная лабораторная информация необходима для профилактики и лечения инфекционных и неинфекционных болезней. Во многих случаях выбор метода лечения в значительной степени зависит от данных медицинских лабораторий, а во время вспышек заболеваний или других событий, представляющих непосредственную опасность для здоровья населения, лаборатории играют ключевую роль, как в исследовании этих проблем, так и в механизмах реагирования. Лаборатории также играют решающую роль в процессе надзора и реагирования. В этой связи мониторинг и оценка лабораторных мощностей требуют стандартизированного подхода и методологии. Версия ВОЗ «Инструмент для оценки лабораторий» на наш взгляд является наиболее приемлемым и всеобъемлющим для оценки деятельности микробиологических лабораторий.

Заключение. Для достижения поставленной цели развития микробиологической диагностики в стране необходимо решить следующие задачи:

- совершенствовать организационное построение лабораторной сети и структуру ее учреждений;
- оптимизировать задачи и функции для микробиологических лабораторий осуществляющих клинико-диагностические исследования и государственный санитарный надзор;
- определить минимальный стандарт оснащения и типовую номенклатуру надзорных исследований, в соответствии с функциями лаборатории;
- постоянно совершенствовать нормативную, методическую, информационную и материально-техническую базы;
- создать республиканскую систему внешних оценок качества проведения микробиологических исследований, основанную на устойчивой работе референтных лабораторий и организации межлабораторных сличительных испытаний республиканского уровня;
- обеспечить надлежащие условия и качество — проведения исследований/испытаний в соответствии с действующим национальным законодательством, а также международными стандартами в сфере биобезопасности;
- обеспечить научно-методическое сопровождение деятельности микробиологических лабораторий;
- совершенствовать механизм обеспечения микробиологических лабораторий оборудованием и диагностическими изделиями медицинского назначения, используя ресурсы республиканского и местных бюджетов;
- обеспечить подготовку, повышение квалификации и переподготовку кадров с учетом достижений современной медицинской науки, требований законодательства и рекомендаций Всемирной организации здравоохранения;

— применить критерии оценки деятельности микробиологических лабораторий, основанные на рекомендациях ВОЗ.

Вышеперечисленные цель и задачи концепции развития микробиологической службы соответствуют долговременным национальным интересам и долгосрочным целям устойчивого социально-экономического развития Республики Беларусь, что позволит повысить уровень санитарно-эпидемиологического благополучия и будет способствовать снижению заболеваемости населения.

Литература

1. Камышева, К. Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований / К. Камышева. — СПб. : «Феникс», 2016. — 347 с.
2. Жебрун, А. Б. Микробиология и иммунология, вызовы времени / А. Б. Жебрун // Инфекция и иммунитет. — 2011. — Т. 1, № 1. — С. 7–8.
3. Ефимочкина, Н. Р. Эмерджентные бактериальные патогены в пищевой микробиологии / Н. Р. Ефимочкина. — М. : Издательство РАМН, 2008. — 256 с.
4. Германович, Ф. А. Первые итоги и перспективы развития централизованных микробиологических исследований (анализ работы микробиологической лаборатории государственного учреждения Минский городской центр гигиены и эпидемиологии) / Ф. А. Германович, Н. Н. Левшина, Н. Д. Коломиец // Медицина. — 2007. — № 3. — С. 28–31.
5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практич. руководство / под ред. акад. РАМН Г. Г. Онищенко, акад. РАМН В. В. Кутырева. — изд. 2-е, переработ. и дополн. — М. : ЗАО «Шико», 2013. — 560 с.
6. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории / Н. А. Маянский [и др.] // Вопр. диагностики в педиатрии. — 2011. — Т. 3, № 5. — С. 20–25.
7. Габидова, А. Э. Экология и резистентность / А. Э. Габидова, А. М. Фахрутдинов, В. А. Галынкин // Изв. СПбГТИ (ТУ). — 2016. — № 37. — С. 37–41.

PROSPECTS OF DEVELOPMENT OF MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

*N.D. Kolomiets¹, O.V. Tonko¹, N.N. Levshina², S.S. Filipenok, E.V. Fedorovich³,
N.V. Dudchik⁴, S.B. Voytik⁵, A.G. Krasko⁶, V.V. Gulin³, I.N. Glinskaya³, L.K. Naroichik³*

¹Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education;

²Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology;

³Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health;

⁴Research & Practical Center of Hygiene;

⁵Minsk Regional Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health;

*⁶Republican Research & Practical Center of Epidemiology & Microbiology,
Minsk, Belarus*

The concept of development of microbiological diagnostics in the Republic of Belarus has been prepared. Its goal is to improve the structure and functions of microbiological laboratories of health care institutions, to increase the effectiveness of clinical studies and sanitary microbiological tests aimed at improving the quality of medical care for the population and improving state sanitary surveillance in the Republic of Belarus.

Keywords: microbiological research, concept, accreditation, laboratory support, diagnostic tests.

Поступила 14.09.2017

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МАТРИКСА МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ К ФЕРМЕНТАМ И АНТИСЕПТИКАМ

Н.Э. Колчанова, Б.Б.Н. Фершиши, В.К. Окулич, С.А. Сенькович, В.В. Алексейкова
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
Витебск, Беларусь

Резюме. Бактериальные биопленки имеют существенное значение в клинической медицине, рядом исследований доказано, что экзополимерный матрикс биопленки может ограничивать диффузию веществ и связывать антимикробные препараты, препятствовать воздействию на бактериальную клетку факторов системы иммунитета. Выполнена оценка устойчивости экзополимерного матрикса монобиопленок изолятов, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом и гнойно-воспалительными заболеваниями к воздействию антисептиков и ферментов: диметилсульфоксиду 25 %, перекиси водорода 3 %, хлоргексидину 2 и 0,05 %, дезоксирибонуклеазе, гиалуронидазе I типа, трипсину, протеиназе К, альфа-амилазе. Показано, что наиболее активно разрушали экзополимерный матрикс диметилсульфоксид и протеиназа К. Обнаружена значительная межвидовая и внутривидовая гетерогенность устойчивости матрикса биопленок изученных изолятов бактерий. Анализ трех- и двухкомпонентных биопленок между собой показал повышение устойчивости двухкомпонентной биопленки *Streptococcus* spp. + *Candida* spp. к исследуемым ферментам и антисептикам.

Ключевые слова: биопленки, хирургические инфекции, экзополимерный матрикс, хронический периодонтит

Введение. До недавнего времени считалось, что планктонные формы являются единственной формой существования бактерий, при котором одиночные бактериальные клетки свободно находятся в жидкой среде. Однако в последние годы, благодаря использованию новых методов исследования, было показано, что подавляющая часть (более 98 %) бактерий, обитающих в природных экосистемах, существуют в иммобилизованном на твердой поверхности состоянии, образуя специфические конгломераты — биопленки. В настоящее время биопленкой называют живое, постоянно обновляющееся сообщество микроорганизмов, необратимо прикрепленных на биогенном или абиогенном субстрате и друг к другу, окруженных внеклеточным полимерным материалом (матриksom), продуцируемым этими же бактериями. Такая организация бактериальных сообществ служит естественным селективным барьером между бактериальными клетками, обитающими в них, и окружающей средой, обеспечивают защиту бактерий от других конкурирующих микроорганизмов [1, 2].

Бактериальные биопленки имеют существенное значение в клинической медицине, так как играют важную роль в возникновении хронических инфекционных процессов, особенно при введении в организм человека различных имплантов, лечебно-диагностических устройств и инструментов — катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца, контактных линз [3, 4]. В настоящее время полагают, что 60–65 % инфекционных заболеваний связаны с возбудителями, способными формировать биопленки.

Важной особенностью биопленок является их высокая устойчивость к неблагоприятным воздействиям, включая устойчивость к антибактериальным препаратам, что в значительной степени обусловлено наличием экзополимерного матрикса. Показано, что экзополимерный матрикс биопленки может ограничивать диффузию веществ и связывать антимикробные препараты, препятствовать воздействию на бактериальную клетку факторов системы иммунитета. Показано, что отрицательно заряженные экзополисахариды матрикса биопленок весьма эффективно

защищают бактерии от гидрофильных и положительно заряженных антибиотиков, например, аминогликозидов [5].

Одним из эффективных способов борьбы с инфекцией, вызванной возбудителем, образующим биопленку, может являться разрушение экзополимерного матрикса, поскольку это резко снижает устойчивость бактерий к различным факторам, в том числе антибактериальным препаратам.

Цель исследования: определить чувствительность матрикса микробной биопленки к ферментам и антисептикам.

Материалы и методы исследования. Нами изучены микробные биопленки 25 клинических изолятов, полученных от пациентов с хроническим периодонтитом и гнойно-воспалительными заболеваниями на базе бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» и кафедры клинической микробиологии УО ВГМУ. Смоделировано 5 многовидовых биопленок *in vitro*: трехкомпонентная биопленка — *Streptococcus sanguinis* + *Streptococcus oralis* + *Streptococcus mitis*; двухкомпонентная биопленка — *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* + *Candida albicans*, *Streptococcus anginosus* + *Candida albicans*.

Для формирования смешанных биопленок мы использовали стандартную методику моделирования биопленки на полимерной мембране в прогрессивно истощающейся среде. Оценка способности различных агентов разрушать матрикс бактериальных биопленок производилась посредством разработанного ранее метода [6]. Для пересчета единиц оптической плотности в мкг/мл выделенного Конго-красного использовалась формула: $X = (0,101 + 11,04 * [E_{\text{оптическая плотность пробы}} - E_{\text{оптическая плотность контроля}}])^2$

Нами проведено определение способности к разрушению суспензии экзополимерного матрикса следующими ферментами: альфа-дезоксирибонуклеазы, гиалуронидазы I типа, трипсина, протеиназы K, альфа-амилазы панкреатической. Все ферменты брались в концентрации 1 мг/мл. Также нами исследованы некоторые антисептики: диметилсульфоксид 25 %, перекись водорода 3 %, хлоргексидин 2 и 0,05 %.

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных таблиц «Statistica» (Version 10–Index, StatSoft Inc., США).

Результаты исследования. При исследовании всех изолятов наибольшая способность к разрушению экзополимерного матрикса биопленок из антисептиков наблюдалась у диметилсульфоксида 25 % (63,25; 36,95–71,86 мкг/мл), что было достоверно ($p < 0,001$) выше, чем у всех других исследованных агентов. Из ферментов относительно высокая способность к разрушению матрикса биопленки обнаружена у протеиназы K (18,83; 6,28–34,97 мкг/мл), что достоверно ($p < 0,05$) превышало активность других исследованных агентов (таблица 1).

Таблица 1. — Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс биопленок

Активное вещество	Me, LQ — UQ, мкг/мл
Диметилсульфоксид 25 %	63,25; 36,95–71,86
Перекись водорода 3 %	0,03; 0–0,35
Хлоргексидин 2 %	0; 0–1,21
Хлоргексидин 0,5 %	0; 0–0,09
Ацетилцистеин	0,02; 0–0,26
Протеиназа K	18,83; 6,28–34,97
Гиалуронидаза I типа	1,52; 1,12–6,71
Альфа-ДНК-аза	2,41; 0,38–14,67
Трипсин	3,46; 1,74–12,95
Альфа-амилаза	0; 0–0,38

Изученные нами однокомпонентные (моно-) микробные биопленки при анализе полученных данных показали значительную межвидовую и внутривидовую гетерогенность устойчивости экзополимерного матрикса по отношению к исследуемым ферментам и антисептикам (таблица 2).

Таблица 2. — Способность активных веществ к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки различных микроорганизмов, мкг/мл, Me, LQ – UQ

Исследуемый изолят/ Активное вещество	<i>Streptococcus</i> spp. (n=6)	<i>S. epidermidis</i> (n=4)	<i>S. aureus</i> (n=6)	<i>E. coli</i> (n=6)	<i>P. aeruginosa</i> (n=3)
Гиалуронидаза I (<i>bovine testis</i>)	4,7 1,13–7,5	3,79 2,65–4,14	7,33 1,45–10,1	3,52 0,74–7,65	0,45 0,22–0,54
Трипсин (<i>bovine pancreas</i>)	16,1 3,69–27,3	1,7 1,1–2,5	8,0 1,57–14,1	3,17 2,25–4,01	0,7 0,2–4,1
Протеиназа К (<i>tritrachium album</i>)	44,05 8,1–55,3	5,0 2,8–8,1	11,92 5,1–18,1	28,45 9,7–49,7	3,8 2,0–19,5
Альфа-ДНКаза (<i>human</i>)	16,5 5,1–21,8	1,32 1,1–1,8	1,01 0,73–1,2	0,48 0,04–14,1	1,68 0,1–2,4
Диметилсульфоксид 25 %	89,5 52,1–116,8	21,3 15,1–48,6	39,86 36,9–47,1	54,41 44,5–63,12	14,6 8,9–63,4

Известно, что биопленки *in vivo* состоят из нескольких штаммов микроорганизмов. В результате проведенных экспериментов получены трех- и двухкомпонентные микробные биопленки, сочетание микроорганизмов формировалось с учетом выделения изолятов у пациентов. Смоделированные нами многовидовые биопленки также были изучены на способность ферментов и антисептиков разрушать их экзополимерный матрикс (таблицы 3–5).

Таблица 3. — Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс многовидовых биопленок, мкг/мл, M± σ

Биопленка/ Активное вещество	Многовидовая биопленка <i>Streptococcus</i> spp + <i>Staphylococcus</i> spp	Биопленка <i>Streptococcus</i> spp	Биопленка <i>Staphylococcus</i> spp
Диметилсульфоксид 25 %	55,2±6,8	67,5±21,7	44,4±4,1
Протеиназа К	14,3±8,27	45,7±13,5	10,9±2,3
Гиалуронидаза I типа	5,85±1,6	8,5±1,4	8,5±1,4
Трипсин	3,3±0,7	20,9±4,9	3,9±0,35
Альфа-ДНКаза	4,1±2,3	12,86±2,82	3,9±1,69

Таблица 4. — Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс многовидовых биопленок, мкг/мл, M± σ

Биопленка/ Активное вещество	Многовидовая биопленка <i>Streptococcus</i> spp + <i>Candida</i> spp	Биопленка <i>Streptococcus</i> spp	Биопленка <i>Candida</i> spp
Диметилсульфоксид 25 %	18,25±2,19	20,2±8,4	44,9±22,9
Протеиназа К	0,2±0,1	7,04±1,6	1,8±0,75
Гиалуронидаза I типа	0,58±0,2	1,74±0,23	1,01±0,54
Трипсин	0,03±0,004	3,43±0,32	0,17±0,13
Альфа-ДНКаза	0,056±0,01	1,8±0,42	0,36±0,19

Таблица 5. — Способность исследуемых активных веществ разрушать экзополимерный матрикс многовидовых биопленок, мкг/мл, $M \pm \sigma$

Биопленка/ Активное в-во	1. <i>S. oralis</i> + <i>S. sanguinis</i> + <i>S. mitis</i>	2. <i>Streptococcus</i> spp + <i>Candida</i> spp	3. <i>Streptococcus</i> spp + <i>Staphylococcus</i> spp	P
Диметилсульфоксид 25 %	82,4±1,79	18,25±2,19	55,2±6,8	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
Протеиназа К	41,9±23,22	0,2±0,1	14,3±8,27	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$
Гиалуронидаза 1 типа	3,65±0,68	0,58±0,2	5,85±1,6	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$
Трипсин	14,4±2,08	0,03±0,004	3,3±0,7	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$
Альфа-ДНКаза	0,77±0,2	0,056±0,01	4,1±2,3	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$

При изучении многовидовых биопленок статистических различий с матриксом монобиопленок микроорганизмов, входящих в их состав, не выявлено ($p > 0,05$). В тоже время, анализ трех- и двухкомпонентных биопленок между собой показал повышение устойчивости двухкомпонентной биопленки *Streptococcus* spp + *Candida* spp к исследуемым ферментам и антисептикам.

Выводы.

1. С помощью разработанной ранее модели изучено действие антисептиков и ферментов на матрикс биопленок. Наибольшей способностью к разрушению экзополимерного матрикса обладали 25 % диметилсульфоксид (63,25; 36,95–71,86 мкг/мл) и протеиназа К (8,83; 6,28–34,97 мкг/мл), что было достоверно ($p < 0,001$) выше, чем у всех других исследованных ферментов и антисептиков.

2. Наблюдались значительная межвидовая и внутривидовая гетерогенность устойчивости матрикса биопленок по отношению к исследуемым ферментам и антисептикам.

3. При изучении многовидовых биопленок статистических различий с матриксом монобиопленок микроорганизмов, входящих в их состав, не выявлено ($p > 0,05$). В тоже время, анализ трех- и двухкомпонентных биопленок между собой показал повышение устойчивости двухкомпонентной биопленки *Streptococcus* spp. + *Candida* spp. к исследуемым ферментам и антисептикам.

Литература

- Афиногенова, А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. — 2011. — Т. 3, № 61. — С. 119–125.
- Николаев, Ю. А. Биопленка — “город микробов” или аналог многоклеточного микроорганизма? / Ю. А. Николаев, В. К. Плакунов // Микробиология. — 2007. — Т. 76, № 2. — С. 149–163.
- Образование биопленок стафилококков на поверхности титана и титана суглеродной алмазоподобной пленкой и действие на них низкомолекулярного катионного пептида варнерина/ И. Ш. Трахтенберг [и др.] // Перспективные материалы. — 2013. — № 4. — С. 39–44.

4. Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy / Y.H. An [et al.] // J. Microbiol. Methods. — 1995. — Vol. 24. — P. 29–40.

5. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A / I. Sadovskaya [et al.] // Infect. Immun. — 2005. — Vol. 73, No. 5. — P. 3007–3017.

6. Колчанова, Н. Э. Определение образования микробной биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устойчивости к химическим и биологическим объектам / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, В. Е. Шилин // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2015. — № 3. — С. 56–61.

DETERMINATION OF THE SENSITIVITY OF MICROBIAL BIOFILM MATRIX OF ENZYMES AND ANTISEPTICS

N.E. Kalchanava, B.B.N. Ferchichi, V.K. Okulich, S.A. Sencovich, V.V. Alekseikova
Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Bacterial biofilms are of great importance in clinical medicine. A number of studies have proved that the exopolymer matrix of biofilms can limit the diffusion of different substances, bind antimicrobial agents and protect the bacterial cell from the immunity system factors. The stability of the exopolymer matrix of monobiophilic samples, isolated from patients with chronic periodontitis and purulent-inflammatory diseases were evaluated to the effect of antiseptics and enzymes: dimethylsulfoxide 25 %, hydrogen peroxide 3 %, chlorhexidine 2 % and 0.05 %, deoxyribonuclease, hyaluronidase type I, trypsin, Proteinase K, alpha-amylase. It was shown that dimethylsulfoxide and proteinase K were the most actively destroying the exopolymer matrix substances. A significant interspecific and intraspecific heterogeneity of different matrix isolates stability was found during the study. The analysis of three- and two-component biofilms with each other showed an increase in the stability of the two-component biofilm *Streptococcus spp* + *Candida spp* to the studied enzymes and antiseptics.

Keywords: biofilms, surgical infections, exopolymer matrix, chronic periodontitis.

Поступила 24.08.2017

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИМ ПЕРИОДОНТИТЕ

Н.Э. Колчанова, В.К. Окулич, В.Е. Шилин
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
Витебск, Беларусь

Резюме. Биопленки полости рта устойчивы как к механизмам защиты иммунитета, так и к противомикробным препаратам, таким образом, они представляют собой постоянный источник инфекции. Нами изучена способность формировать биопленку у 106 микроорганизмов, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом. Определена масса биопленок, а также смоделированы многовидовые биопленки. Установлено, что в 100 % случаев биопленку образует *Streptococcus oralis*,

Streptococcus sanguinis, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, наименьшей способностью образовывать биопленку обладали *Gemella haemolisans*, *Gemella morbillorum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.* Масса биопленки, образуемая микроорганизмами, достоверно выше ($p < 0,001$) в тканях периодонта при тяжелой степени тяжести хронического периодонтита, чем тяжелее процесс, тем микроорганизмы обладают большей способностью формировать микробную биопленку.

Ключевые слова: биопленки, хронический периодонтит, матрикс, микроорганизмы

Введение. Благодаря многочисленным исследованиям в современной периодонтологии зубной налет трактуется как биопленка — высокоорганизованное микробное сообщество. Патогенность биопленки зубного налета усиливается тем, что в форме биопленки бактериальные клетки более устойчивы к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам и в меньшей степени подвержены фагоцитозу со стороны клеток хозяина. В полости рта бактериальные биопленки обнаруживаются на поверхностях зубов, десневой борозде, съемных и мостовидных протезах и на слизистых оболочках [1, 2]. Следовательно, контроль биопленки зубной бляшки является основной целью стоматологических профилактических процедур и имеет решающее значение для поддержания оптимально здорового состояния полости рта. Исследования биопленок в естественных условиях ограничены не только из-за этических аспектов, но и сложностью забора биологического материала. Поэтому, модели биопленки *in vitro* играют важное значение в медицинской науке для лучшего понимания существования и развития таких микробных сообществ [3, 4].

Целью исследования являлось изучение образования матрикса биопленки микроорганизмами при хроническом периодонтите.

Материалы и методы исследования. С помощью разработанных методов культивирования и качественного определения микробной биопленки нами изучены свойства 106 клинических изолятов, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом разной степени тяжести на базе бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» и кафедры клинической микробиологии УО ВГМУ. Для формирования смешанных биопленок мы использовали стандартную методику моделирования биопленки с применением 96-луночного полистиролового пластикового планшета [5]. Мы моделировали *in vitro* трехкомпонентную биопленку — *Streptococcus sanguinis* + *Streptococcus oralis* + *Streptococcus mitis*; двухкомпонентную биопленку — *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* + *Candida albicans*, *Streptococcus anginosus* + *Candida albicans*.

Проведены исследования с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF, с использованием флуоресцентного красителя DAPI. Масса биопленки, сформированной микроорганизмами, определялась по разработанной ранее формуле [6]: $X = 226,28 * [E_{\text{оптическая плотность пробы}} - E_{\text{оптическая плотность контроля}}]^{1,2755}$.

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных таблиц «Statistica» (Version 10-Index, StatSoft Inc., США).

Результаты исследования. Среди изученных штаммов стрептококков ($n=93$) способность формировать биопленку была обнаружена у 83,9 % изолятов, среди стафилококков ($n=9$) 88,9 %, среди грибов *Candida spp* ($n=3$) 100 %, дополнительно был исследован АТСС штамм *Eikenella corrodens* в качестве стандарта, а также многовидовая биопленка.

У пациентов с хроническим периодонтитом обнаружено, что наиболее часто способность формировать биопленки встречалась у представителей *Streptococcus spp* при тяжелом течении заболевания 94,1 %, при средней степени тяжести 83,9 % изолятов формируют биопленку, при легкой 71,9 %. Подробная информация о способности формировать биопленку представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Процент изолятов, образующих биопленку в зависимости от степени тяжести хронического периодонтита

Изоляты выделенные от пациентов	Общее кол-во	Процент изолятов образующих биопленку, %
Тяжелая степень		
<i>Streptococcus oralis</i>	13	100
<i>Streptococcus mitis</i>	9	100
<i>Streptococcus anginosus</i>	4	100
<i>Streptococcus mutans</i>	2	100
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	100
<i>Lactococcus lactis</i>	2	0
<i>Streptococcus sangvinis</i>	1	100
<i>Gemella morbillorum</i>	1	100
Средняя степень		
<i>Streptococcus oralis</i>	9	100
<i>Streptococcus mitis</i>	5	80
<i>Gemella morbillorum</i>	4	75
<i>Streptococcus sangvinis</i>	4	100
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	100
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	100
<i>Lactococcus lactis</i>	2	50
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1	100
<i>Gemella haemolisans</i>	1	0
Легкая степень		
<i>Streptococcus oralis</i>	10	100
<i>Streptococcus mitis</i>	10	33,3
<i>Streptococcus sangvinis</i>	4	100
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	90
<i>Gemella morbillorum</i>	2	0
<i>Streptococcus pneumonia</i>	1	50
<i>Leuconostoc spp</i>	1	0
<i>Gemella haemolisans</i>	1	0

Исходя из полученных данных, в 100 % случаев биопленку образует *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sangvinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, наименьшей способностью образовывать биопленку обладали *Gemella haemolisans*, *Gemella morbillorum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp*.

При проведении исследований с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF, с использованием флуоресцентного красителя DAPI установлена характерная для биопленок трехмерная организация (рисунок 1). Толщина двухсуточной биопленки *S.oralis* колебалась от 50 до 60 мкм.

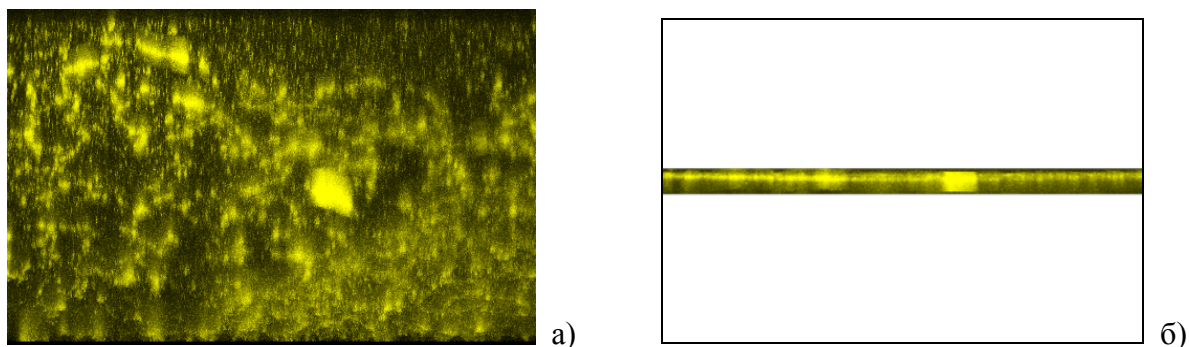


Рисунок 1. — Изображение биопленки *S. oralis*, полученное с помощью конфокальной микроскопии (а — горизонтальная, б — вертикальная плоскости)

Масса биопленки стрептококков (n=97), выделенных от пациентов составила 8,95; 4,5–22,8 мкг/лунку, масса выделенных стафилококков (n=9) составила 10,9; 5,86–53,6 мкг/лунку, масса АТСС штамма *Eikenella corrodens* 12,08 мкг/лунку, масса *Candida spp* (n=3) составила 14,06; 9,3–11,6 мкг/лунку. Для нас важным было изучить закономерность образования биопленки микроорганизмами, выделенными у пациентов с разной степенью тяжести течения хронического периодонтита, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Масса биопленки *Streptococcus spp* в зависимости от тяжести течения хронического периодонтита

Степень тяжести	N	мкг/лунку, Me, LQ - UQ	p
1. Легкая	32	3,83; 0,0–5,57*	p ₁₋₂ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001
2. Средняя	31	8,85; 5,7–19,26*	
3. Тяжелая	34	22,94; 15,2– 40,06*	

Исходя из полученных данных, масса биопленки, образуемая микроорганизмами, достоверно выше (p<0,001) в тканях периодонта при тяжелой степени тяжести хронического периодонтита. Таким образом, чем тяжелее процесс, тем микроорганизмы, выделенные от пациентов, обладают большей способностью формировать микробную биопленку.

При характеристике массы отдельных микроорганизмов нами выбраны наиболее часто встречающиеся при хроническом периодонтите, данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. — Масса биопленки микроорганизмов периодонтального кармана при хроническом периодонтите

Изоляты выделенные от пациентов	Общее кол-во	мкг/лунку, Me, LQ-UQ
Тяжелая степень хронического периодонтита		
<i>Streptococcus oralis</i>	13	23,3; 17,3–41,9
<i>Streptococcus mitis</i>	9	38,1; 32,2–42,9
Средняя степень хронического периодонтита		
<i>Streptococcus oralis</i>	9	12,2; 6,47–18,1
<i>Streptococcus mitis</i>	5	5,89; 5,7–8,9
Легкая степень хронического периодонтита		
<i>Streptococcus oralis</i>	10	5; 4,6–5,5
<i>Streptococcus mitis</i>	10	4,24; 1,89–6,06

При сравнении полученных данных между микроорганизмами в пределах одной группы в зависимости от тяжести хронического периодонтита достоверных отличий не выявлено ($p > 0,05$). В ходе статистического анализа между микроорганизмами из разных групп, но одного вида, были выявлены различия среди вида *S. oralis*: достоверно выше образование биопленки при тяжелой (1) степени, затем при средней (2) и наименее выражена при легкой (3) степени тяжести ($p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,001$, $p_{2-3} < 0,01$). При анализе данных вида *S. mitis* достоверные различия в массе биопленки были между тяжелой (1) и средней (2), тяжелой и легкой (1) степенью тяжести, а при средней и легкой — достоверных различий не выявлено ($p_{1-2} < 0,01$, $p_{1-3} < 0,001$, $p_{2-3} > 0,05$). Таким образом, такой фактор патогенности, как способность микроорганизмов формировать биопленку, связан с тяжестью хронического периодонтита, при более тяжелом течении заболевания наблюдается увеличение массы микробной биопленки. Исходя из полученных данных, не у всех микроорганизмов отмечается выраженное увеличение массы биопленки при прогрессировании воспалительного процесса, так, наиболее заметное изменение массы биопленки отмечалось у вида *S. oralis*, что также связано с высокой встречаемостью данного микроорганизма в периодонтальных карманах при хроническом периодонтите.

Нами было изучено формирование матрикса биопленки в динамических условиях, для этого, с учетом всех преимуществ и недостатков, разработано устройство для формирования биопленок в динамических условиях [7]. Положительный эффект предлагаемого устройства состоит в том, что за счет постоянного и равномерного распределения потока питательной среды на поверхности исследуемых образцов формируется микробная биопленка. Применение предлагаемого устройства позволяет использовать его в микробиологических лабораториях для проведения исследований, связанных с изучением структуры биопленки, образованной микроорганизмами, и в дальнейшем определять ее чувствительность к ферментам и антисептикам.

С использованием разработанной ранее динамической модели для выращивания биопленки нами проведено сравнение массы биопленки при различных условиях, данные представлены на рисунках 2–7.

После анализа полученных данных было установлено, что применение динамических условий либо уменьшало образование биопленки микроорганизмами, либо не изменяло возможности изолята для образования биопленки по сравнению с ее количеством в статических условиях.

Нами были смоделированы *in vitro* трехкомпонентная биопленка — *Streptococcus sanguinis* + *Streptococcus oralis* + *Streptococcus mitis*; двухкомпонентная биопленка — *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* + *Candida albicans*, *Streptococcus anginosus* + *Candida albicans*.

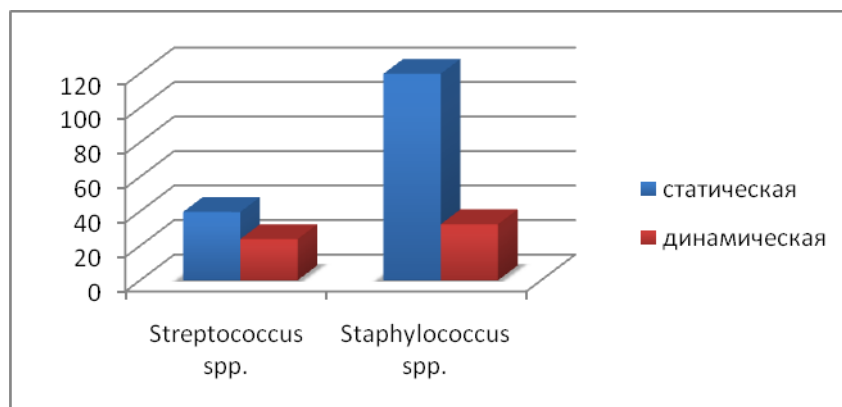
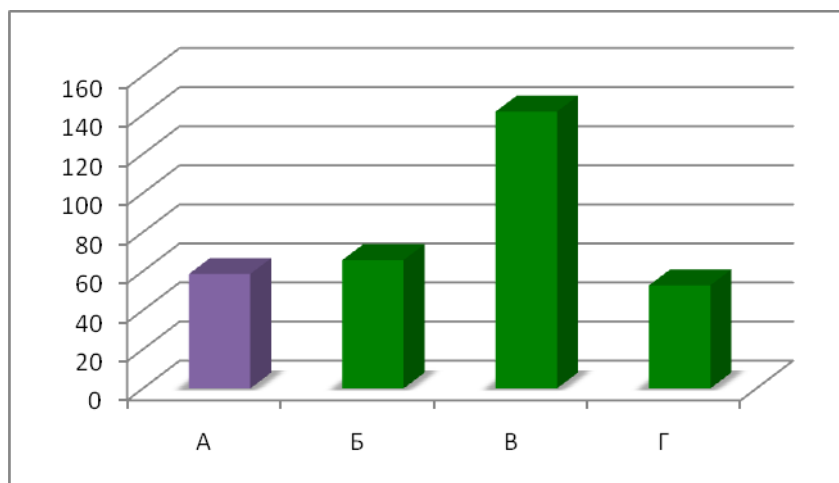
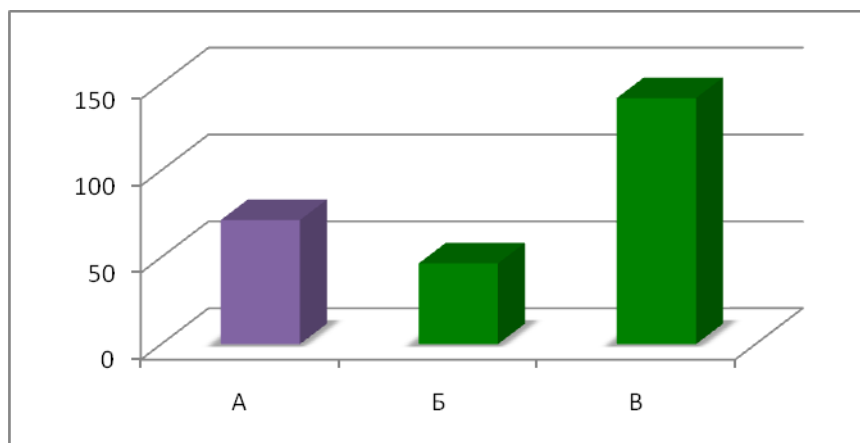


Рисунок 2. — Масса *Streptococcus spp* и *Staphylococcus spp* в зависимости от условий среды, мкг/лунку



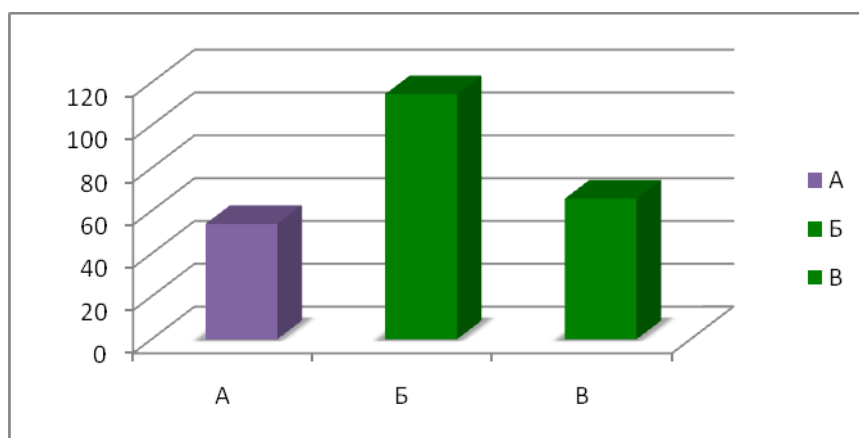
А — трехкомпонентная био пленка, Б — *Streptococcus sanguinis*, В — *Streptococcus oralis*, Г — *Streptococcus mitis*

Рисунок 3. — Соотношение массы смоделированной трехкомпонентной био пленки с однородной (моно-) био пленкой *Streptococcus sanguinis* + *Streptococcus oralis* + *Streptococcus mitis*; мкг/лунку



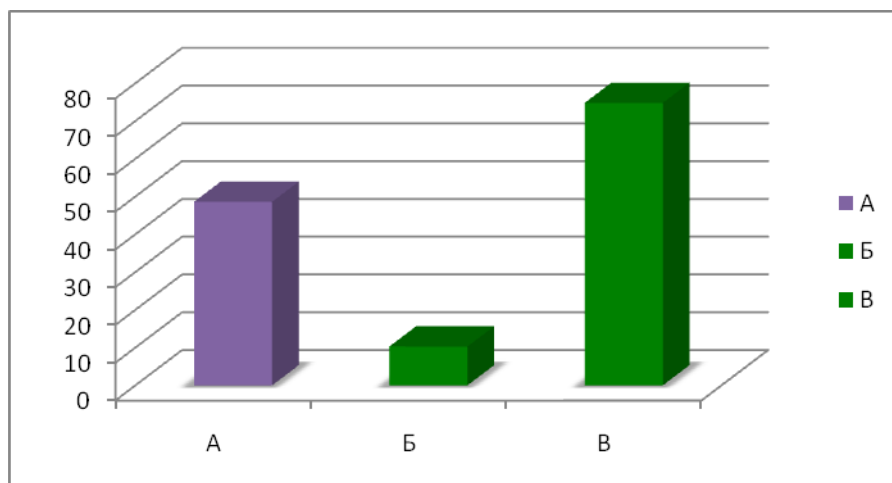
А — трехкомпонентная био пленка, Б — *Staphylococcus epidermidis*, В — *Streptococcus oralis*

Рисунок 4. — Соотношение массы смоделированной двухкомпонентной био пленки с однородной (моно-) био пленкой *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus oralis*; мкг/лунку

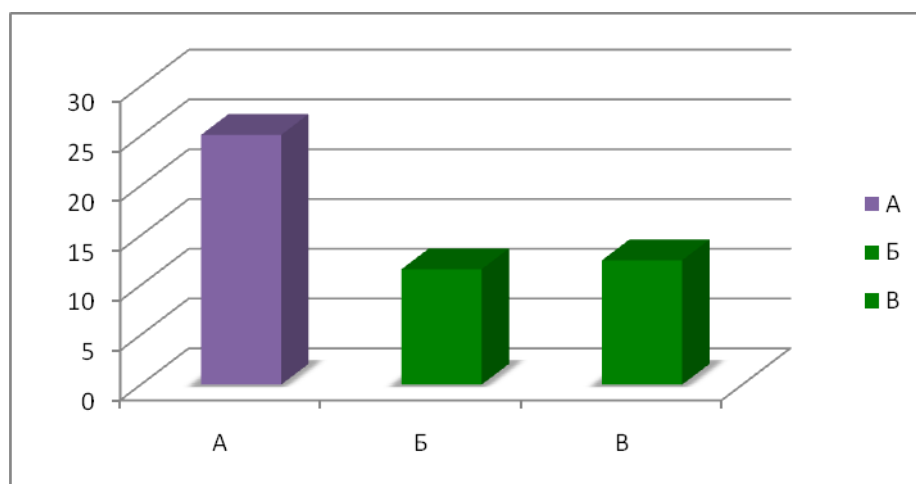


А — трехкомпонентная био пленка, Б — *Staphylococcus epidermidis*, В — *Streptococcus sanguinis*

Рисунок 5. — Соотношение массы смоделированной двухкомпонентной био пленки с однородной (моно-) био пленкой *Staphylococcus epidermidis* + *Streptococcus mitis*; мкг/лунку



А — трехкомпонентная биопленка, Б — *Canddida albicans*, В — *Streptococcus oralis*
Рисунок 6. — Соотношение массы смоделированной двухкомпонентной биопленки с однородной (моно-) биопленкой *Streptococcus oralis* + *Canddida albicans*; мкг/лунку



А — трехкомпонентная биопленка, Б — *Canddida albicans*, В — *Streptococcus anginosus*
Рисунок 7. — Соотношение массы смоделированной двухкомпонентной биопленки с однородной (моно-) биопленкой *Streptococcus anginosus*+ *Canddida albicans*; мкг/лунку

Данные исследования свидетельствуют о морфологической целостности и, соответственно, о жизнеспособности бактерий при длительном их нахождении на полимерной поверхности в составе биопленок.

Выводы.

1. На основе разработанной ранее методики определена способность микроорганизмов периодонтального кармана формировать биопленку, установлено, что в 100 % случаев биопленку образует *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sangvinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, наименьшей способностью образовывать биопленку обладали *Gemella haemolisans*, *Gemella morbillorum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*

2. Определена масса биопленки, сформированной микроорганизмами, исходя из полученных данных, патогенный потенциал микроорганизмов увеличивается при более выраженном воспалительном процессе, масса биопленки, образуемая микроорганизмами достоверно ($p < 0,001$) выше в тканях периодонта при тяжелой степени тяжести хронического периодонтита, чем тяжелее процесс, тем больше

микробной биопленки. Однако, не у всех микроорганизмов отмечается выраженное увеличение массы биопленки при прогрессировании воспалительного процесса, так, наиболее заметное изменение массы биопленки отмечалось у вида *S. oralis*, что также связано с высокой встречаемостью данного микроорганизма в периодонтальных карманах при хроническом периодонтите.

3. Данные исследования многовидовых биопленок свидетельствуют о морфологической целостности и, соответственно, о жизнеспособности бактерий при длительном их нахождении на полимерной поверхности в составе биопленок.

Литература

1. Мюллер, Х.-П. Микробиология полости рта / Х.-П. Мюллер // Пародонтология: науч. ред. изд. / Х.-П. Мюллер; пер. на рус. яз. проф. А. М. Политун. — Львов, 2004. — С. 30–35.
2. Gurenlian, J. A. The role of dental plaque biofilm in oral health [Electronic resource] / J. R. Gurenlian // J. Dental Hygiene. — 2007. — Vol. 81, No. 5. — Mode of access : http://jdh.adha.org/content/81/suppl_1/116.full.pdf. — Date of access : 15.08.2017.
3. Role of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in multi-species biofilm formation / K. Bao [et al.] // Microbiology. — 2014. — Vol. 14. — P. 258.
4. Filoche, S. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology / S. Filoche, L. Wong, C. H. Sissons // J. Dent. Res. — 2010. — Vol. 89, No. 1. — P. 8–18.
5. Колчанова, Н. Э. Микробиологические аспекты хронического периодонтита, вызванного бактериями, образующими биопленку / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич // Здоровье и образование в 21 веке. — 2017. — Т. 19, № 4. — С. 26–29.
6. Метод лечения гнойных ран мягких тканей, вызванных возбудителями, способными формировать биопленку: инструкция по применению № 076–0714: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 10.09.2014 / Витебск. гос. мед. ун-т, авт.-сост.: В. И. Петухов [и др.]. — Витебск: ВГМУ, 2014. — 10 с.
7. Устройство для формирования биопленки в динамических условиях : заявка ВУ u20170020 / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, В. Е. Шилин, Ф. В. Плотников; заявитель Витеб. мед. ун-т.; заявл. 30.01.2017.

STUDY OF THE BIOFILM MATRIX FORMATION BY MICROORGANISMS IN CHRONIC PERIODONTITIS

N.E. Kalchanava, V.K. Okulich, V.E. Shilin
Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Since biofilms are resistant both to host defense mechanisms and to antimicrobial agents, they represent an ongoing source of infection. We studied the ability to form biofilm in 106 microorganisms isolated from patients with chronic periodontitis. The mass of biofilms was determined, and multispecific biofilms were modeled. It is found that 100 % of the biofilm forms *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, the least ability to form a biofilm had *Gemella haemolisans*, *Gemella morbillorum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.* Mass biofilm formed by microorganisms is significantly higher ($p < 0,001$) in periodontal tissues in severe severity of chronic periodontitis than heavier process, the microorganisms have a greater ability to form a microbial biofilm.

Keywords: biofilms, chronic periodontitis, matrix, microorganisms.

Поступила 15.08.2017

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИДОВОГО СОСТАВА КИШЕЧНОЙ БИФИДОФЛОРЫ В ПАРАХ МАТЬ-РЕБЕНОК

С.А. Костюк¹, С.Ю. Нагибович², Ю.А. Григоренко³,
О.С. Полуян¹, Т.В. Руденкова¹, Т.В. Глинкина¹

¹ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»», Минск, Беларусь;

³УЗ «Минская областная детская клиническая больница», Минск, Беларусь

Резюме. Изучены особенности видового состава бифидобактерий в парах мать-ребенок. Чистые культуры штаммов бифидобактерий были выделены из фекалий детей и их матерей и идентифицированы до вида методами ПЦР и секвенирования. У детей, находящихся на грудном вскармливании, выявлено присутствие широкого видового разнообразия бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. infantis*, *B. dentum*) в отличие от детей, находящихся на искусственном вскармливании. Участие штаммов бифидобактерий присущих матерям в ранней колонизации кишечника детей, находящихся на грудном вскармливании было подтверждено обнаружением у них генетически идентичных штаммов бифидобактерий методами амплификации консервативных повторяющихся последовательностей (REP-ПЦР) и сиквенс-анализа.

Ключевые слова: бифидобактерии, видовое разнообразие, микрофлора кишечника, молекулярно-генетический анализ

Введение. Важное значение симбионтной микрофлоры для организма человека к настоящему времени общепризнано и базируется на результатах исследований с использованием живых моделей, диагностики на молекулярно-генетическом уровне. Симбиотическая микрофлора составляет основу микроэкологии человека. Наиболее представительным как в количественном отношении, так и по видовому составу является микробное сообщество пищеварительного тракта. Видовой состав микрофлоры существенно различается в зависимости от отдела пищеварительного тракта, что обусловлено анатомическими и химико-физиологическими особенностями каждого биотопа, а также, определяется биологическими особенностями микроорганизмов, локализующихся в конкретном эпизоде. В норме в различных отделах пищеварительного тракта микроорганизмы симбионтной микрофлоры формируют специфический биоценоз, позволяющий поддерживать условия, наиболее благоприятные для осуществления функций пищеварительной системы. Поверхность слизистых оболочек является местом наиболее тесного взаимодействия организма хозяина с колонизирующими его микроорганизмами, и именно слизистая кишечника представляет собой наиболее значительную область такого контакта.

Ведущая роль в нормализации микробиоценоза кишечника и поддержании гомеостаза человеческого организма принадлежит бифидобактериям, которые оказывают разностороннее положительное влияние на физиологические функции организма человека. Создавая в кишечнике кислую среду за счет продуцирования уксусной и молочной кислот (в соотношении 3:2), а также в небольших количествах муравьиной и янтарной кислот, они препятствуют развитию патогенной и гнилостной микрофлоры путем антагонистической активности. Кроме того, в процессе жизнедеятельности бактерий рода *Bifidobacterium* образуются антибиотикоподобные вещества, которые подавляют рост патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, клостридий, стафилококков. Благодаря действию летучих жирных кислот бифидобактерии активизируют абсорбцию ионов натрия, калия, хлора, кальция, магния, железа, цинка и витамина D, регулируют содержание бикарбоната натрия

и уровень рН, поддерживая тем самым водный, электролитный и кислотно-щелочной балансы макроорганизма. Изучено участие этих микроорганизмов в синтезе аминокислот, белков, пантотеновой кислоты, витаминов К и группы В. Бактерии рода *Bifidobacterium* нормализуют перистальтику кишечника, предотвращают метеоризм, участвуют в утилизации пищевых субстратов, стимулируют пристеночное пищеварение. Тесная взаимосвязь со слизистой оболочкой кишечника определяет важную роль бифидобактерий в формировании колонизационной резистентности [1].

Иммунотормозящая активность бактерий рода *Bifidobacterium* проявляется в регуляции различных сторон гуморального и клеточного иммунитета — активации выработки IgA и торможении деградации секреторного IgA в кишечнике, стимуляции фагоцитоза, интерферонообразования и продукции интерлейкинов [1, 2].

Формирование нормальной микрофлоры кишечника человека начинается еще на самых ранних этапах жизни. Считается, что первичным источником бактерий, колонизирующих пищеварительный тракт ребенка, являются родовые пути матери, во время прохождения которых новорожденный заглатывает их содержимое вместе с бактериями вагинальной микрофлоры [3].

После рождения колонизация кишечника ребенка продолжается не только штаммами бактерий, поступающих от матери, но и микроорганизмами от других источников, находящихся во внешней среде. Однако указанные предположения, касающиеся участия штаммов бактерий матери в первичной колонизации гастроинтестинального тракта ребенка, до последнего времени остаются недостаточно подтвержденными научными данными. Это, в свою очередь связано с малой информативностью используемых для решения данной задачи микробиологических методов, которые основаны, прежде всего, на изучении морфологических, физиолого-биохимических и культуральных свойств бактериальных штаммов, изолируемых от матери и ее ребенка [1, 3, 4].

Активное внедрение молекулярно-генетических технологий в практику микробиологических исследований способствует получению новой информации о составе и свойствах интестинальной микрофлоры у людей разного возраста. В последние годы был разработан целый арсенал методов с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ее модификаций, позволяющих быстро и достоверно определить видовую принадлежность выделяемых микроорганизмов [5].

Цель исследования: провести молекулярный мониторинг микрофлоры кишечника и установить особенности видового состава бактерий рода *Bifidobacterium* в зависимости от возраста детей, вида вскармливания.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были 26 пар мать-ребенок, при этом в исследовании были включены клинически здоровые дети в возрасте от 0 до 10 месяцев. Материалом для исследования служили фекалии. Выделение бифидобактерий проводили на питательной среде для бифидобактерий (среде Блаурокка). Все последующие манипуляции осуществлялись с чистыми культурами бифидобактерий.

Идентификацию бифидобактерий проводили с использованием ПЦР с видоспецифичными праймерами. (*Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum* и *B. dentum*). Поскольку межвидовой уровень сходства бифидобактерий по гену 16S рРНК варьирует в пределах 93–99 % и многие виды бифидобактерий филогенетически близки между собой, то не идентифицированные методом ПЦР штаммы определяли путем секвенирования фрагмента гена 16S рРНК [6].

С использованием метода амплификации консервативных повторяющихся последовательностей (REP-ПЦР) был проведен сравнительный анализ штаммов

бифидобактерий в 26 парах мать-ребенок для установления их генетической идентичности, исследовано субвидовое штаммовое разнообразие кишечных бифидобактерий у детей и получены данные о транслокации штаммов от матери к ребенку.

Результаты исследования и обсуждение. В ходе видовой идентификации штаммов, в толстой кишке у детей в возрасте от 0 до 10 месяцев качественный состав бифидобактерии был представлен следующими видами: *B. bifidum* — у 17 (65,38 %) детей, *B. longum* — у 8 (30,77 %) детей, распределение *B. breve*, *B. adolescentis* и *B. catenulatum* было одинаковым — по 15,38 % (n=4), тогда так присутствие *B. angulatum*, *B. infantis* и *B. dentum* составило по 11,5 % (n=3).

В группе матерей было определено меньшее видовое разнообразие данного микроорганизма. Основным видом бифидобактерий был *B. longum* (88,46 %, n=23), тогда как другие представители данной группы выявлялись значительно реже, например, *B. bifidum* — 53,85 % (n=14), *B. adolescentis* — 19,23 % (n=5), *B. breve* — 19,23 % (n=5), *B. catenulatum* — 3,85 % (n=1) (таблица 1).

Таблица 1 — Видовое разнообразие бифидобактерий у матерей и детей

Вид бифидобактерий	Количество образцов (%)	
	Всего	
	матери (n=26)	дети (n=26)
<i>B. bifidum</i>	14 (53,85 %)	17 (65,38 %)
<i>B. longum</i>	23 (88,46 %)	8 (30,77 %)
<i>B. breve</i>	5 (19,23 %)	4 (15,38 %)
<i>B. adolescentis</i>	5 (19,23 %)	4 (15,38 %)
<i>B. catenulatum</i>	1 (3,85 %)	4 (15,38 %)
<i>B. angulatum</i>	-	3 (11,54 %)
<i>B. infantis</i>	-	3 (11,54 %)
<i>B. dentum</i>	-	3 (11,54 %)

Далее было проведено сравнение видового репертуара бифидобактерий у 26 детей, находящихся на грудном вскармливании (n=16) и на искусственном (n=10). У детей, находящихся на искусственном вскармливании, не было обнаружено присутствие таких видов бифидобактерий, как *B. infantis*, *B. angulatum* и *B. breve*, а частота обнаружения *B. bifidum* составила 50,0 % (n=5). В то же время у данной группы детей был выделен вид *B. adolescentis* (40,0 %, n=4), который превалирует в микробиоценозе взрослого человека (таблица 2).

Таблица 2 — Видовое разнообразие бифидобактерий у матерей и детей, находящихся на искусственном вскармливании

Вид бифидобактерий	Количество образцов (%)	
	Всего	
	матери (n=10)	дети (n=10)
<i>B. bifidum</i>	5 (50,0 %)	5 (50,0 %)
<i>B. longum</i>	8 (80,0 %)	2 (20,0 %)
<i>B. breve</i>	1 (10,0 %)	-
<i>B. adolescentis</i>	2 (20,0 %)	4 (40,0 %)
<i>B. catenulatum</i>	-	3 (30,0 %)
<i>B. angulatum</i>	-	-
<i>B. infantis</i>	-	-
<i>B. dentum</i>	-	1 (10,0 %)

Для детей, находящихся на грудном вскармливании, было характерно присутствие бифидобактерий видов *B. bifidum* (75,0 %, n=12), *B. longum* (37,5 %, n=6), *B. breve* (25,0 %, n=4). Также было выявлено присутствие *B. angulatum* (18,75 %, n=3), *B. infantis* (18,75 %, n=3) и *B. dentum* (12,5 %, n=2) (таблица 3).

Таблица 3 — Видовое разнообразие бифидобактерий у матерей и детей, находящихся на грудном вскармливании

Вид бифидобактерий	Количество образцов (%)	
	Всего	
	матери (n=16)	дети (n=16)
<i>B. bifidum</i>	9 (56,25 %)	12 (75,0 %)
<i>B. longum</i>	15 (93,75 %)	6 (37,5 %)
<i>B. breve</i>	4 (25,0 %)	4 (25,0 %)
<i>B. adolescentis</i>	3 (18,75 %)	-
<i>B. catenulatum</i>	1 (6,26 %)	1 (6,26 %)
<i>B. angulatum</i>	-	3 (18,75 %)
<i>B. infantis</i>	-	3 (18,75 %)
<i>B. dentum</i>	-	2 (12,5 %)

В отличие от ранее принятого представления о вагинальной микрофлоре матери как первоисточнике микробной колонизации новорожденного, в последние годы получены убедительные доказательства на генетическом уровне ведущей роли в этом процессе микрофлоры ее кишечника [3, 4].

Для сравнительного анализа штаммов бифидобактерий в парах мать-ребенок, было проведено изучение качественного состава кишечной бифидофлоры в группе, включавшей 16 пар мать-ребенок. Все дети и матери на момент обследования были клинически здоровы и не имели в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Дети с момента рождения находились на грудном вскармливании.

Бактериальный геном содержит большое количество повторяющейся ДНК, локализованной как в его кодирующей, так и некодирующей части. Нуклеотидные повторы отличаются размером повторяющейся единицы, протяженностью или количеством повторов, ориентацией, расположением и др. Такие повторы наиболее подвержены вариативности количества повторяющихся единиц, т.е. представляют высокополиморфные участки генома. Таким образом, отличия в спектрах продуктов амплификации будут обусловлены протяженностью повтора.

По результатам RFLP-ПЦР были охарактеризованы спектры ампликонов у каждого из исследованных штаммов бифидобактерий в парах мать-ребенок, при этом учитывали общее количество фрагментов, их размер. Определение видовой принадлежности выделенных бифидобактерий позволило установить, что некоторые из обследуемых были источниками двух или большего количества изолятов одного вида. Данный факт подтверждает субвидовое штаммовое разнообразие бифидобактерий.

У 11 (из 16) пар мать-ребенок были выявлены совпадающие по видовой принадлежности штаммы бифидобактерий. Видами, которые встречались и в группе матерей и в группе детей, были *B. longum* в 6 парах мать-ребенок, *B. bifidum* — в 4 парах, *B. breve* — в одной паре. Для того чтобы установить, являются ли данные штаммы матерей и детей генетически идентичными, был использован метод RFLP-ПЦР. В тех случаях, когда RFLP-ПЦР профили изучаемых бифидобактерий, выделенных

от матери и ребенка, имели 100 % идентичность по числу, а также массе электрофоретических полос, они, рассматривались как принадлежащие одному штамму соответствующего вида бактерий, и, наоборот, когда продукты ПЦР при их электрофоретическом разделении давали различные профили полос, изоляты рассматривали как различные штаммы одного вида бифидобактерий. Для подтверждения идентичности штаммов, установленной методом ПЦР, дополнительно проводили анализ фрагмента гена 16S рРНК бифидобактерий методом сиквенс-анализа. По результатам проведенных исследований генетическая идентичность штаммов в парах мать-ребенок была подтверждена у всех пар (n=11), выявленных методом ПЦР.

Таким образом, более половины детей (68,75 %) находящихся на грудном вскармливании были колонизированы штаммами бифидобактерий, генетически идентичными штаммам, которые были выделены от их матерей.

Заключение. Широкое внедрение в практику микробиологических исследований генетических методов, основанных на амплификационной технологии (ПЦР), дает возможность быстро и достоверно осуществлять детекцию видового репертуара бифидобактерий, присутствующих в кишечнике, что, в свою очередь, позволяет более эффективно решать задачи изучения особенностей комбинационного разнообразия видов бифидобактерий в данном эпизоде. Использование молекулярно-генетических методов, позволяет проводить и сравнение видового разнообразия бифидобактерий у детей и взрослых людей.

В ходе проведенных исследований установлено, что в ранние периоды физиологической адаптации у грудных детей, находящихся на грудном вскармливании, для микрофлоры кишечника характерны высокое видовое разнообразие бифидобактерий (*B. bifidum*, *B. longum* и *B. breve*, *B. angulatum*, *B. infantis*, *B. dentum*) и присутствие некоторых видов бифидобактерий, которые не встречаются у взрослых людей (*B. angulatum*, *B. infantis*, *B. dentum*). С использованием метода RFLP-ПЦР подтверждена транслокация штаммов бифидобактерий от матери к ребенку при грудном вскармливании и их роль в ранней колонизации его кишечника.

Литература

1. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание : в 3 т. / Б. А. Шендеров. — М. : Грант, 1998; 2001.
2. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Г. Г. Онищенко [и др.]. — М. : ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. — 607 с.
3. Стефани, Д. В. Иммунология и иммунопатология детского возраста : руководство для врачей / Д. В. Стефани, Ю. Е. Вельтищев. — М. : Медицина, 1996. — 384 с.
4. Фролова, Н. А. Особенности формирования микробиоценоза детей раннего возраста в зависимости от микробного пейзажа кишечника матери : автореф дис. ... канд. мед. наук / Н. А. Фролова. — Смоленск, 2002. — 23 с.
5. Костюк, С. А. Молекулярно-биологические методы в медицине : монография / С. А. Костюк. — Минск : БелМАПО, 2013. — 327 с.
6. Костюк, С. А. Молекулярно-генетические методы в мониторинге микробных сообществ кишечника / С. А. Костюк // Медицинские новости. — 2017. — № 1. — С. 62–66.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE INTESTINAL BIFIDOFLORA SPECIES COMPOSITION IN MOTHER-INFANT PAIRS

S.A. Kostiuk¹, S.Y. Nagibovich², Y.A. Grigorenko³, O.S. Poluyan¹,
T.V. Rudenkova¹, T.V. Glinkena¹

¹Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus;

²The Mother and Child National Research Center, Minsk, Belarus;

³Minsk Regional Children's Clinical Hospital, Minsk, Belarus

The particularities of the species composition of bifidobacteria, in mother-infant pairs have been investigated. Pure cultures of bifidobacteria strains were isolated from faeces of children and adults and identified to species by PCR and sequencing. In breast feeding infants the wide variety of *Bifidobacterium* species (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. infantis*, *B. dentum*) were identified in contrast to artificial feeding infants. The early colonization of the intestine of infants by mother strains of bifidobacteria has been confirmed by the detection of genetically identical strains of bifidobacteria in mothers and their infants by repetitive element palindromic PCR (REP-PCR) and sequence-analysis.

Keywords: *Bifidobacterium*, species variety, intestinal microflora, molecular-genetic analysis.

Поступила 09.08.2017

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *LACTOBACILLUS SPECIES* ПРИ НОРМОЦЕНОЗЕ, МЕЗОЦЕНОЗЕ И ДИСБИОЗЕ ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН

С.А. Костюк, О.С. Полуян, Т.В. Руденкова, И.Г. Шиманская

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

Резюме. С использованием разработанных методов выявления различных видов лактобацилл, основанных на использовании ПЦР в режиме реального времени и специально подобранных пар видоспецифичных праймеров, определен видовой состав *Lactobacillus* spp. во влагалище пациенток с бактериальным вагинозом и у практически здоровых женщин. *Lactobacillus iners* — являются основным видом лактобацилл, который выявляется как у пациентов с бактериальным вагинозом (при мезоценозе (89,66 %) и при дисбиозе (100,0 %)), так и у практически здоровых женщин при нормоценозе влагалища (50,0 %). Характерной чертой микробного пейзажа влагалища пациенток с бактериальным вагинозом является снижение видового разнообразия лактобацилл в эпителии.

Ключевые слова: бактериальный вагиноз, микробиоценоз влагалища, видовой состав лактобацилл.

Введение. Бактериальный вагиноз — дисбиотическое состояние, при котором происходит нарушение естественного баланса в микробиоценозе влагалища между лактобациллярной микрофлорой и условно-патогенными анаэробными микроорганизмами. Частота бактериального вагиноза составляет около 30 % в общей

популяции, а у женщин, имеющих обильные выделения из влагалища, достигает 80 % [1]. В то же время около 50 % пациенток с бактериальным вагинозом не имеют жалоб, что связано с нетипичным течением и повышением частоты его стертых форм [2, 3].

Бактериальный вагиноз ассоциирован с нарушениями репродуктивного здоровья женщины: гормональной недостаточностью яичников, воспалительными заболеваниями органов малого таза, диспластическими процессами шейки матки, инфекционными осложнениями после оперативных вмешательств, неудачными попытками ЭКО, невынашиванием беременности и такими акушерскими осложнениями, как хориоамнионит, гестоз, плацентарная недостаточность, аномалии родовой деятельности, послеродовый эндометрит [4-7].

Внедрение новых молекулярных технологий в лабораторную диагностику позволило установить, что *Gardnerella vaginalis* не является единственным микроорганизмом, участвующим в развитии бактериального вагиноза [1, 8]. У женщин с бактериальным вагинозом идентифицировано более 35 бактериальных морфотипов, содержащихся во влагалище, и недавно описаны группы бактерий рода *Atopobium*, *Megasphaera*, *Sneathia*, *Prevotella*, а также группы бактерий, включенные в род клостридий, обозначенные как бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом 1, 2 и 3 [8, 9]. До сих пор отсутствует единый подход к диагностике бактериального вагиноза, что требует пересмотра клинических и лабораторных критериев заболевания.

Цель исследования: разработать методику ПЦР для изучения видового разнообразия лактобацилл (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus vaginalis*) в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта пациенток и оценить присутствие различных видов лактобацилл при нормоценозе, мезоценозе и дисбиозе влагалища.

Материалы и методы исследования. В основную группу исследования (I) были включены пациентки с установленным диагнозом бактериальный вагиноз (n=61), контрольную группу (II) составили 12 практически здоровых женщин (нормоценоз влагалища).

Для диагностики бактериального вагиноза использовались клинические критерии Амсея (1983г.): наличие обильных влагалищных выделений; pH влагалищного отделяемого выше 4,5; положительный аминовый тест; обнаружение «ключевых» клеток при микроскопическом исследовании отделяемого влагалища.

Определение pH отделяемого влагалища проводили с использованием индикаторных тест-полосок («Фармаско», Украина), с шагом 0,3–0,5 от 4,0 до 7,0. Аминовый тест проводили путем смешивания капли вагинальных выделений с каплей 10 % раствора КОН. Отделяемое влагалища для микроскопического исследования получали специальными тампонами и помещали на два предметных стекла.

Для оценки состояния пациенток также применяли критерии Ньюгента, основанные на микроскопическом выявлении в вагинальном отделяемом трех бактериальных морфотипов, таких как крупные грамположительные бактерии (лактобациллы), грамотрицательные или грамвариабельные бактерии (*Gardnerella vaginalis* и анаэробные бактерии) и изогнутые грамотрицательные или грамвариабельные бактерии (*Mobiluncus*).

Оценку результатов по критериям Ньюгента проводили по шкале от 0 до 10 в зависимости от количества микроорганизмов в поле зрения светового микроскопа (таблица 1).

Таблица 1 — Оценка морфотипа бактерий по критериям Ньюгента

Баллы	Морфотип А/ <i>Lactobacilli</i>	Морфотип В / <i>Gardnerella</i>	Морфотип С / <i>Mobiluncus</i>
0	> 30 микроорганизмов	Отсутствие микрофлоры	Отсутствие микрофлоры
1	5–30 микроорганизмов	1 микроорганизм	1 микроорганизм
2	1–4 микроорганизмов	1–4 микроорганизм	1–4 микроорганизм
3	1 микроорганизм	5–30 микроорганизмов	5–30 микроорганизмов
4	Отсутствие микрофлоры	>30 микроорганизмов	> 30 микроорганизмов

Результат исследования оценивали по сумме баллов (А+В+С) и интерпретировали следующим образом:

- 0–3 балла — нормальный (физиологический) микробиоценоз;
- 4–6 баллов — промежуточный микробиоценоз;
- 7–10 баллов — бактериальный вагиноз.

Для исследований с применением метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала и заднего свода влагалища, которые помещали в пробирку, содержащую транспортную среду для мазков (ЗАО «Вектор-Бест», РФ).

Для изучения микробиологического статуса репродуктивного тракта пациентов использовали ПЦР-тест-системы «Фемофлор 8» («ДНК-технология», РФ).

Результаты исследования и обсуждения. В рамках дифференциации видового состава лактобацилл в отделяемом влагалища у женщин с бактериальным вагинозом с мезоценозом и дисбиозом и у практически здоровых с физиологическим микробиоценозом влагалища методом ПЦР были подобраны соответствующие видоспецифические праймеры для определения основных видов лактобацилл, которые присутствуют в вагинальном биотопе: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*:

Для выявления *L. crispatus*:

LcrisF: 5'-AGCGAGCGGAACТАACAGATTTAC-3'

LcrisR: 5'-AGCTGATCATGCGATCTGCTT-3'.

Для выявления *L. iners*:

InersF: 5'-GTCTGCCTTGAAGATCGG-3'

InersR: 5'-ACAGTTGATAGGCATCATC-3'.

Для выявления *L. jensenii*:

LjensF: 5'-AAGTCGAGCGAGCTTGCCTATAGA-3'

LjensR: 5'-СТТСТТТКАТGCGAAAGTAGC-3'.

Для выявления *L. gasseri*:

LgassF: 5'-AGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTG-3'

LgassR: 5'-ТСТТТТАААСТСТАGACATGCGTC-3'.

Для выявления *L. vaginalis*:

LV16s_23s_F: 5'-GCCTAACCATTTGGAGGG-3'

LV16s_23s_R3: 5'-CGATGTGTAGGTTTCCG-3'.

Состав амплификационной смеси был универсален для всех выявляемых генов и различался только вносимой парой праймеров:

- 1,0 мкл смеси эквивалентных концентраций соответствующих пар праймеров;
- 1,0 мкл SYBR Green PCR (ОДО «Праймтех», РБ);

- 15,0 Quick-Load Taq 2X Master Mix (Праймтех, РБ);
- 8,0 мкл деионизированной воды;
- 5 мкл выделенной ДНК.

Общий объем амплификационной смеси составил 30 мкл.

Программа амплификации для *L. crispatus*: 95°C — 15 мин; 40 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 60 с, 72°C — 20 с.

Программа амплификации для *L. iners*: 95°C — 15 мин; 35 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 55 с, 72°C — 60 с.

Программа амплификации для *L. jensenii*: 95°C — 15 мин; 40 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 55 с, 72°C — 60 с.

Программа амплификации для *L. gasseri*: 95°C — 15 мин; 40 циклов: 95°C — 15 с, 57°C — 60 с, 72°C — 60 с.

Программа амплификации для *L. vaginalis*: 95°C — 15 мин; 37 циклов: 95°C — 15 с, 56°C — 30 с, 72°C — 30 с.

Амплификацию проводили на термоциклере «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия)

По результатам клинического обследования основная группа пациенток I была разделена на 2 подгруппы: в подгруппу Ia было включено 29 женщин с мезоценозом (промежуточным микробиоценозом), в подгруппу Ib — 32 пациентки с дисбиозом влагалища. У всех пациенток контрольной группы (II) был установлен физиологический микробиоценоз влагалища.

У пациенток с бактериальным вагинозом, как с мезоценозом, так и с дисбиозом влагалища (подгруппы Ia и Ib), было выявлено наличие ассоциаций условно патогенных факультативных и облигатных анаэробных микроорганизмов. В подгруппе пациенток с дисбиозом влагалища (подгруппа Ib) достоверно чаще по сравнению с пациентками с мезоценозом влагалища (подгруппа Ia) и практически здоровых женщин (II группа) выявлялись облигатные анаэробы, такие как *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Candida* spp., *Peptostreptococcus* и *Atopobium vaginae* ($p < 0,05$).

Показатель общей бактериальной массы у пациентов всех обследованных групп находился в пределах от 8,9 (8,33/11,03) lg в группе практически здоровых женщин до 11,75 (11,25/12,9) lg у пациенток с мезоценозом влагалища. В группе пациенток с дисбиозом влагалища показатель общей микробной массы был выявлен на уровне 13,5 (12,9/14,2) lg. Статистически достоверные различия по данному показателю были выявлены между пациентами Ib подгруппы и II группы ($p < 0,05$), тогда как между показателями пациентов подгрупп Ia и Ib, а также Ia подгруппы и II группы статистически достоверные различия не были установлены ($p > 0,05$).

Концентрация всех анаэробных микроорганизмов была выше в биологическом материале пациентов Ib подгруппы в сравнении с аналогичными показателями пациенток Ia подгруппы и контрольной группы. В подгруппе пациенток с дисбиозом (Ib) были выявлены достоверно более высокие концентрации ДНК таких микроорганизмов как *Gardnerella vaginalis* / *Prevotella bivia* / *Porphyromonas* spp. ($> 10^6$ ГЭ/мл) и *Atopobium vaginae* ($> 10^5$ ГЭ/мл) по сравнению со значениями, полученными в подгруппе пациенток с мезоценозом (Ia) и в контрольной группе (II) ($p < 0,05$).

В ходе выполнения данного этапа исследования не было выявлено достоверных различий в количественном содержании *Lactobacillus* spp. между показателями пациентов основной группы исследования (пациенты Ia и Ib подгрупп) по сравнению с показателями пациентов контрольной группы (II): подгруппа Ia — 9 (8,9/10,75) lg; подгруппа Ib — 7,45 (5,5/10,5) lg; группа II — 10,7 (8,8/9,95) lg.

Таким образом, к основным характеристикам микробной флоры обследованных пациентов с бактериальным вагинозом можно отнести увеличение концентрации

анаэробных микроорганизмов на фоне нормальной концентрации *Lactobacillus* spp., что в классической дерматовенерологии расценивается как признак атипичного течения бактериального вагиноза.

В биологическом материале пациентов контрольной группы (практически здоровые женщины) с физиологическим микробиоценозом влагалища (n=12) были выявлены различные виды *Lactobacillus*: *L. iners* — 50,0 % случаев (n=6), *L. crispatus* — 33,33 % случаев (n=4), *L. vaginalis* — 16,67 % случаев (n=2), *L. jensenii* — 16,67 % случаев (n=2), *L. gasseri* — 8,33 % случаев (n=1).

При этом у 2 пациенток (16,67 %) было выявлено одновременное присутствие нескольких видов лактобацилл: в одном случае была обнаружена ассоциация *L. iners* и *L. crispatus*, в другом случае — ассоциация *L. iners* и *L. vaginalis*. В биологическом материале остальных 10 пациенток (83,33 %) было выявлено присутствие только одного вида лактобацилл: у 4 пациенток (33,33 %) присутствовала *L. iners*, у 3 пациенток (25,0 %) — *L. crispatus*, у 2 пациенток (16,67 %) — *L. jensenii*, у 1 пациентки (8,33 %) — *L. gasseri*, у 1 пациентки (8,33 %) — *L. vaginalis*.

При исследовании видового состава лактобацилл в отделяемом влагалища пациенток с промежуточным микробиоценозом влагалища (мезоценозом) (пациенты подгруппы Ia, n=29) было выявлено преобладание *L. iners*, присутствие которых было установлено в 89,66 % случаев (n=26), наличие *L. crispatus* было установлено в 10,34 % случаев (n=3). У пациенток данной подгруппы не было выявлено в биологическом материале таких видов лактобацилл как *L. vaginalis*, *L. jensenii* и *L. gasseri*.

В подгруппе пациенток с дисбиозом влагалища (подгруппа Ib, n=32) были выявлены лактобациллы только одного вида — *L. iners*.

Выводы. Течение бактериального вагиноза сопровождается увеличением концентрации анаэробных микроорганизмов (*Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Porphyromonas* spp., *Atopobium vaginae*) в биологическом материале пациентов как с мезоценозом, так и с дисбиозом, однако количественное содержание *Lactobacillus* spp. у данных пациентов не имеет достоверных различий с показателями пациентов с физиологическим нормоценозом.

С использованием разработанных методов выявления различных видов лактобацилл, основанных на использовании ПЦР-РВ и специально подобранных пар праймеров, впервые определен видовой состав *Lactobacillus* spp. во влагалище пациенток с бактериальным вагинозом и у практических здоровых женщин. В ходе проведения исследований установлено, что при физиологическом микробиоценозе влагалища в эпителии присутствуют различные виды лактобацилл (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *L. jensenii*, *L. gasseri*) с превалированием вида *L. iners*. В 83,33 % случаев лактобациллы присутствуют в эпителии в моноварианте, однако могут находиться и в ассоциации друг с другом (*L. iners* и *L. crispatus*; *L. iners* и *L. vaginalis*).

У пациентов с бактериальным вагинозом видовое разнообразие лактобацилл снижается. Так при мезоценозе влагалища микробный пейзаж данного эпителии характеризуется присутствием *L. iners* (89,66 %) и *L. crispatus* (10,34 %), а при дисбиозе выявляется лишь *L. iners*.

L. iners — являются основным видом лактобацилл, который выявляется как у пациентов с бактериальным вагинозом (при мезоценозе (89,66 %) и при дисбиозе (100,0 %)), так и у практически здоровых женщин при нормоценозе влагалища (50,0 %). Характерной чертой микробного пейзажа влагалища пациенток с бактериальным вагинозом является снижение видового разнообразия лактобацилл в эпителии.

Литература

1. Прилепская, В. Н. Патология шейки матки и генитальные инфекции / В. Н. Прилепская. — М. : Медицина, 2012. — 344 с.

2. Изучение видового состава микрофлоры слизистых урогенитального тракта у пациенток с бактериальным вагинозом и их половых партнеров / И. Г. Шиманская [и др.] // Медицинские новости. — 2015. — № 5. — С. 46–50.
3. Кира, Е. Ф. Бактериальный вагиноз / Е. Ф. Кира. — М. : Медицина, 2012. — 472 с.
4. Костюк, С. А. Особенности локальной защиты репродуктивного тракта при урогенитальных инфекциях: иммунологические и микробиологические аспекты / С. А. Костюк // Медицинские новости. — 2009. — № 15. — С. 55–59.
5. Epidemiology and causes of preterm birth / R. L. Coldenberg [et al.] // J. Lancet. — 2008. — Vol. 371. — P.75–84.
6. Eckert, L. O. Acute vulvovaginitis / L. O. Eckert // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 355, No. 5. — P. 1244–1252.
7. Schwebke, J. R. New concept in the etiology of bacterial vaginosis / J. R. Schwebke // Cur. Infect. Dis. Rep. — 2009. — Vol. 11, No. 2. — P. 143–147.
8. Лабораторная диагностика бактериального вагиноза — оценка состояния влагалищного биотопа / Н. А. Бадыгина [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2014. — № 1. — С. 112–119.
9. Костюк, С. А. Валидация молекулярно-биологических методов лабораторной диагностики / С. А. Костюк // Медицинские новости . — 2012. — № 4. — С. 16–19.

LACTOBACILLUS SPECIES SPECIFIC VARIETY IN WOMEN WITH NORMOCENOSIS, MESOCENOSIS AND DYSBIOSIS OF VAGINA

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

Lactobacillus spp. specific structure in a vagina of patients with bacterial vaginosis and practically healthy women is defined with using of the developed methods for *Lactobacillus* various kinds revealing, based on use real-time PCR and specially picked up species specific pairs of primers. *Lactobacillus iners* are a primary lactobacillus species reveling both in patients with bacterial vaginosis (with mesocenosis (89,66 %) and with dysbiosis (100,0 %)), and in practically healthy women with normocenosis of vagina (50,0 %). *Lactobacillus* specific variety decreasing in epitope is a characteristic feature of a microbial composition in vagina of patients with bacterial vaginosis.

Keywords: bacterial vaginosis, microbiocenosis of vagina, lactobacillus specific variety.

Поступила 09.08.2017

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО УЧЕТА ТЕСТ-СИСТЕМ С ЦЕЛЬЮ ИДЕНТИФИКАЦИИ СТРЕПТОКОККОВ

В.К. Окулич, Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова, В.Е. Шилин, Н.К. Бабака
УО «Витебский государственный медицинский университет», Витебск, Беларусь

Резюме. Разработана компьютерная программа bactoSTREP, предназначенная для идентификации клинически значимых микроорганизмов семейства стрептококков по биохимическим свойствам, а также для определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, что позволяет значительно повысить качество процедуры идентификации стрептококков. Программа bactoSTREP дает возможность создать

автоматизированное рабочее место микробиолога, включающее в себя фотометр, адаптированный для анализа результатов по цвету пробы в автоматическом режиме и персональный компьютер. Программа представлена в виде инсталляционного пакета, созданного при помощи InstallShield Express Borland Limited Edition 3.5. Программа разработана в среде программирования Delphi v.7.0. Для работы с программой необходим IBM совместимый компьютер с операционной системой семейства Windows (не ниже Windows XP SP3) с правами администратора. Для комфортной работы рекомендуется использование монитора с разрешением экрана не менее 1024x768 пикселей. Для работы с фотометром Ф300 необходим последовательный порт типа RS232C либо USB.

Ключевые слова: программное обеспечение, тест-система, стрептококки.

Введение. Лечение и профилактика инфекционных заболеваний является одной из приоритетных в здравоохранении. Более трети пациентов хирургического профиля страдают гнойно-воспалительными заболеваниями, вызванными условно-патогенными микроорганизмами; послеоперационные гнойные осложнения развиваются в среднем у 20 % пациентов; в общей структуре летальности в хирургических стационарах количество смертельных случаев в связи с инфекционными осложнениями колеблется от 40 % до 70 % [1].

Проведение рациональной антибиотикотерапии стрептококковых инфекций невозможно без быстрой и точной этиологической диагностики. Тест-системы для быстрой биохимической идентификации основаны на определении биохимических свойств микроорганизмов. Существует огромное разнообразие тест-систем для идентификации, основанных на учете изменения субстратного профиля (в том числе хромогенного или флуорогенного субстрата). В качестве материала для идентификации используют чаще всего чистую культуру, из которой готовят суспензию в концентрации стандарта оптической плотности, затем раствор суспензии вносят в лунки с субстратами данной тест-системы. Учет может осуществляться автоматически, используя фотометр с последующей компьютерной обработкой данных или визуально. Разработкой тест-систем для идентификации микроорганизмов занято не менее 20 известных фирм, среди них следует назвать: *Becton Dickinson*, *Abbott Diagnostics*, *Difco/Pasco Laboratories*, *Roche Diagnostics*, *Vitek Systems*, *BioMerieux*. Тест-системы, разработанные вышеперечисленными фирмами, позволяют ускорить диагностику многих видов микроорганизмов до 4–6 ч с момента выделения чистой культуры. Степень совпадения данных по идентификации вида бактерии, полученной с помощью тест-систем, с референс-методами достигает 85–91 %. Однако, результаты сильно зависят от вида микроорганизма и возможности его биохимической идентификации (в ряде случаев преимущество имеет серологическая классификация, например, сальмонелл, где возможности определения по биохимическим признакам ограничены). Существуют отечественные тест-системы для идентификации возбудителя и определения его антибиотикорезистентности: «ИД-ЭНТ» и «ИД-АНА», «АБ-ГРАМ(-)», «АБ-ПСЕВ», «АБ-СТАФ», «АБ-ЭНТЕР» и «АБ-АН» [2]. Однако для идентификации стрептококков тест-систем в Республике Беларусь не производится, что определило актуальность нашего исследования.

Цель — разработать программное обеспечение для автоматического учета тест-системы идентификации стрептококков.

Материалы и методы. В качестве материалов для исследования использовали патологические ткани из гнойно-некротического очага, а также биоптаты глубоких тканей, которые являются более информативным материалом по сравнению с соскобами и мазками. Обследовано 427 пациентов с хирургической инфекцией различной локализации, проходящие лечение на базе УЗ ВОКБ; выделено 82 штамма

стрептококков; определена чувствительность стрептококков к 16 антибактериальным препаратам из 8 групп. Сбор патологического материала из гнойно-некротического очага производили ватным тампоном, который помещали в стерильную пробирку, а также использовали биоптаты глубоких тканей, которые являются более информативным материалом по сравнению с мазками и соскобами. Содержимое абсцессов и флегмон помещали в герметически закупоренные флаконы со средой для накопления неспорогенных анаэробов.

Для обнаружения различных видов стрептококков использовали 5 % кровяной Колумбия-агар. Идентификацию проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMérieux». Для идентификации использовались стрипы rapid ID 32 STREP. В качестве материала для идентификации использовали хорошо изолированную колонию на чашке или чистую культуру в пробирке, из которой готовили суспензию в концентрации стандарта оптической плотности, затем раствор суспензии вносили в лунки со средами (субстратами) данной тест-системы и далее следовали инструкции по применению. Учет осуществлялся автоматически с помощью АТВ Expression фирмы «bioMérieux». Для определения чувствительности стрептококков к антибиотикам в большинстве случаев использовали тест-систему фирмы «bioMérieux» (Франция): АТВ STREP 5.

В процессе разработки тест-системы для идентификации стрептококков не имеющей отечественных аналогов в рамках темы задания государственной научно-технической программы «Разработать тест-системы для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам возбудителей стрептококковой инфекции с учетом способности формировать биопленку», возникла необходимость создания компьютерной программы для автоматического учета результатов.

Результаты исследования и обсуждение. Нами создана программа bactoSTREP, которая предназначена для идентификации микроорганизмов по их субстратному профилю. Исходную идентификационную таблицу (матрицу) с массивом данных о признаках идентифицируемых микроорганизмов и их видах создали на основе данных из определителя бактерий Берджи. Программа позволяет определять видовую принадлежность микроорганизмов в ручном и автоматическом режиме, сохранять результаты анализов на диске, закреплять за штаммами коды, формировать отчеты с результатами лабораторных исследований, корректировать и создавать новые идентификационные таблицы. При программировании методик, для наглядности, сделали возможным задавать ожидаемый цвет ферментативной реакции в виде графического объекта. Аналитическую обработку результатов в программе производили с использованием методов многомерной статистики — кластерного анализа.

Кластерный анализ, как метод аналитической обработки данных, выбран нами исходя из следующего:

- В качестве признаков для идентификации (исходного многомерного массива данных) в нашем случае выступают числовые значения частоты возникновения ферментативных реакций в зависимости от микробного вида, взятых из таблиц определителя бактерий Берджи.

- В ходе эксперимента возможно отклонение некоторых анализируемых признаков от эталона, поэтому можно говорить о том, что видовая идентификация носит вероятностный характер и необходим механизм минимизации ошибочного определения вида.

- Идентификация микроорганизмов производится объединением их в группы на основе критерия минимума различия между признаками, которые их описывают. Поэтому для сравнения двух наблюдений пригодно понятие меры близости

(расстояния) между анализируемыми объектами, тогда сами объекты можно представить как точки в многомерном пространстве.

- Выбор метода обработки исходных статистических данных производится на основе тех или иных допущений относительно природы закона распределения изучаемого многомерного признака.

- Анализируемые переменные (ферментативная активность) не подчиняются нормальному закону распределения.

- В нумерической таксономии основным критерием пригодности того или иного метода считается его математическая обоснованность.

В результате использования изложенных принципов разработана компьютерная программа **bactoSTREP**, которая предназначена для идентификации клинически значимых микроорганизмов семейства стрептококков по биохимическим свойствам, а также для определения чувствительности к антибиотикам. Программа включает в себя два исполняемых файла **ID** и **SENSITIVE_BIOFILM**, каждый из которых соответственно выполняет одну из поставленных задач.

Данная программа может применяться в бактериологических лабораториях в составе автоматизированного рабочего места врача-микробиолога с использованием фотометра универсального Ф300 и тест-систем ИД-Стр, АБ-Стр, АБ-СтрБ на базе стандартных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетов.

ID позволяет провести идентификацию с использованием кластерного анализа. Идентификация возможна после качественной оценки цвета субстратного профиля исследуемого образца планшета с постановочной тест-системой ИД-Стр одним из способов: инструментальный учет при помощи Ф300, визуальный учет, аналитический расчет по фотографии планшета в формате jpg.

SENSITIVE_BIOFILM позволяет: определять чувствительность к антибиотикам стрептококков и энтерококков. Программа представлена в виде инсталляционного пакета, созданного при помощи InstallShield Express Borland Limited Edition 3.5. Программа разработана в среде программирования Delphi v.7.0.

Для работы с программой необходим IBM совместимый компьютер с операционной системой семейства Windows (не ниже Windows XP SP3) с правами администратора. Для комфортной работы рекомендуется использование монитора с разрешением экрана не менее 1024x768 пикселей.

Для работы с фотометром Ф300 необходим последовательный порт типа RS232C либо USB.

Работа с программой подразумевает предварительную пробоподготовку одной из тест систем: ИД-Стр, АБ-Стр с дополнительным стрипом АБ-СтрБ с последующей обработкой результатов. В случае работы с jpg файлом для наилучшего достижения результатов необходимо сделать фотографию, соблюдая ряд требований: проводить съемку в хорошо освещенном помещении, вдали от прямых солнечных лучей, без вспышки; проводить съемку в центре белого листа бумаги в ракурсе «вид сверху»; объем инокулята в лунках планшета — не менее 150 мкл; разрешение фотографии не менее 1920*1080 пикселей; глубина цвета не менее 5 000 000 цветов.

Заключение. Разработанная компьютерная программа **bactoSTREP** предназначена для идентификации клинически значимых микроорганизмов семейства стрептококков по биохимическим свойствам, а также для определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, позволяет значительно повысить качество процедуры идентификации стрептококков. Программа **bactoSTREP** позволяет создать автоматизированное рабочее место микробиолога, включающее в себя фотометр, адаптированный для анализа результатов по цвету пробы в автоматическом режиме

и персональный компьютер. Программа bactoSTREP зарегистрирована в Национальном центре интеллектуальной собственности (свидетельство от 6.06.2017 № 954).

Литература

1. Колчанова, Н. Э. Микробиологические аспекты хронического периодонтита, вызванного бактериями, образующими биопленку / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич // Здоровье и образование в 21 веке. — 2017. — Т. 19, № 4. — С. 26–29.

2. Шилин, В. Е. Тест-системы «ИД-энтер» и «АБ-грам (-)» для определения этиологической роли грамотрицательных микроорганизмов и спектра их резистентности к антибиотикам при синдроме диабетической стопы / В. Е. Шилин, В. К. Окулич, В. П. Булавкин // Вестник Витебского государственного медицинского университета. — 2011. — Т. 10, № 4. — С. 30–36.

DEVELOPMENT OF THE SOFTWARE FOR AUTOMATIC ACCOUNTING OF TEST SYSTEMS FOR STREPTOCOCCI IDENTIFICATION

*V.K. Okulich, Ph.V. Plotnikov, A.A. Kabanova, V.E. Shilin, N.K. Babaka
Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

The purpose of the study is to develop software for automatic recording of test systems for streptococci identification. The developed computer program bactoSTREP is designed to identify clinically relevant microorganisms of the family of streptococci by their biochemical properties, and also to determine the susceptibility to antibiotics, significantly improving the quality of the procedure for identifying streptococci. The program bactoSTREP allows you to create an automated workplace for a microbiologist, which includes a photometer adapted for analyzing results by sample color in automatic mode and a personal computer.

The program is presented in the form of an installation package created with the help of InstallShield Express Borland Limited Edition 3.5. The program is developed in the programming environment Delphi v.7.0. To work with the program you need an IBM compatible computer with the operating system of the Windows family (not lower than Windows XP SP3) with administrator rights. For comfortable work, we recommend using a monitor with a screen resolution of at least 1024x768 pixels. To work with the F300 photometer, you need a serial port type RS232C or USB.

Keywords: software, test system, streptococci.

Поступила 11.09.2017

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИОННЫХ ИММУНОМАГНИТНЫХ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ CdSe/ZnS НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ПРИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Л.В. Рубаник, А.Н. Асташинок, Г.К. Жавнерко, Н.Н. Полещук

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

Резюме. Представлен результат практического применения инновационной разработки — тест-системы для лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции на основе композиционных иммуномагнитных (1 мкм) и флуоресцентных CdSe/ZnS (2–3 нм) наночастиц. Проанализированы показатели информативности индикации возбудителя *Chlamydia trachomatis*: чувствительность — 97,9 %, специфичность — 95,3 %, точность — 96,7 %. Предлагается внедрение данной диагностической тест-системы в работу клинико-диагностических лабораторий страны.

Ключевые слова: урогенитальный хламидиоз, диагностическая тест-система, флуоресцентные CdSe/ZnS наночастицы, чувствительность, специфичность.

Введение. Принимая во внимание частое отсутствие патогномичных клинических проявлений хламидийной урогенитальной инфекции, высокую частоту бессимптомного течения (примерно у 50 % мужчин и 70 % женщин), тяжелые осложнения (бесплодие, выкидыши, патология плода и новорожденного, заболевания костно-суставной системы), существование различных по биологическим и молекулярно-генетическим свойствам штаммов патогена, поиск высокочувствительных, специфичных и экспрессных методов детекции возбудителя *Chlamydia trachomatis* остается актуальной задачей и имеет важное практическое значение для здравоохранения.

В настоящее время среди всего спектра лабораторных методов, рекомендуемых локальными и международными службами и активно внедряемых в лабораторную практику в связи с высокой чувствительностью, специфичностью, воспроизводимостью и стандартизацией являются методы амплификации нуклеиновой кислоты (МАНК) [1]. Однако общеизвестны такие погрешности ПЦР-реакции как недостаточное количество эпителиальных клеток в забранном материале, наличие ингибиторов реакции в исследуемом биологическом образце, лимитированный предел чувствительности (не менее 5×10^3 ГЭ/мл патогена в пробе) и другие.

Кроме того, генетические перестройки в ключевых генах-мишенях микроорганизмов, являются значимой проблемой для молекулярных методов диагностики. В настоящее время отмечена циркуляция наряду с диким генотипом *C. trachomatis* (world type — wtCT), мутантного «шведского» (new variant — nvCT) и безплазмидного вариантов возбудителя, что обуславливает необходимость как совершенствования и оптимизации молекулярно-биологических методов, так и поиска новых диагностических тестов [1, 2].

В последние годы активно ведутся исследования по разработке нанодиагностик, позволяющих эффективно детектировать в тысячи раз меньшие концентрации белков, ДНК, микроорганизмов, чем это возможно при рутинных технологиях [1, 3, 4–7]. Исследования, направленные на разработку и применение биомаркеров нового поколения для индикации *C. trachomatis* являются перспективным направлением нанобиотехнологии.

Целью работы являлась оценка эффективности применения, разработанного инновационного диагностикума на основе иммуномагнитных и флуоресцентных CdSe/ZnS наночастиц для выявления *C. trachomatis*.

Материалы и методы. Для проведения исследования использован соскобный материал из урогенитального тракта 180 пациентов (n=180). Из них хламидийная инфекция лабораторно верифицирована у 95 человек. Возбудитель *C. trachomatis* не был выявлен ни одним из методов (ПЦР, МФА, культуральным) у 85 обследуемых. Детекцию ДНК возбудителя осуществляли с помощью ПЦР тест-системы АмплиСенс *Chlamydia trachomatis* — Ерн, ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия. Реакцию иммунофлуоресценции проводили с использованием тест-системы «Хлами-Скан», ЛабДиагностика, Россия. Выделение хламидий в культуре клеток выполняли по стандартной методике [8]. Параллельно соскобный материал всех пациентов исследован с помощью разработанной и зарегистрированной в Республике Беларусь тест-системы «Набор реагентов для лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции с использованием флуоресцентно-меченных иммуномагнитных частиц» (ТУ ВУ 100558032.335 — 2016, серия № 6, срок годности до 12.06.2017). В качестве положительного контроля использовали лабораторный штамм *C. trachomatis* СТ-869 Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека. В качестве отрицательного контроля использовали интактную 2-х суточную культуру клеток McCoу. Учет результатов осуществляли на флуоресцентном микроскопе «Nikon E50i» (Япония) при возбуждающем свете с длиной волны 490 нм и фильтром на 520–540 нм.

Результаты исследования и их обсуждение. Используя инновационный подход, разработана новая отечественная диагностическая тест-система для лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции с использованием флуоресцентно-меченных иммуномагнитных частиц. Ее основу составляют два компонента: биоспецифический планшет (8-ми луночная стеклянная поверхность, химически модифицированная полимерами и активированная биотинилированными противохламидийными IgG) и флуоресцентно-меченные иммуномагнитные частицы (композиционные конъюгаты из магнитных микросфер диаметром 1 мкм и флуоресцентных наночастиц размером 2–3 нм на основе селенида кадмия (CdSe/ZnS), меченных биотинилированными противохламидийными IgG). Основным свойством иммуномагнитных частиц является способность сепарировать и концентрировать возбудитель из биоматериала. При последующем нанесении на поверхность биоспецифического планшета адсорбированных с магнитным носителем частиц возбудителя происходит специфическое связывание. Наличие флуоресцентной метки на поверхности магнитных микросфер позволяет легко визуализировать *C. trachomatis* с помощью люминесцентной микроскопии.

Лабораторная диагностика с позиции доказательной медицины предусматривает сравнение любого нового диагностического теста с имеющимся «золотым» стандартом в контролируемых клинических исследованиях. В связи с чем в сериях испытаний была проведена оценка диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и точности (ДТ) разработанной методики детекции *C. trachomatis* с использованием тест-системы на основе активированных сенсорных поверхностей и функционально-активных композиционных наноконъюгатов. Для этого в качестве метода сравнения выбран культуральный. Из 180 образцов клинического материала исследованных методом выделения хламидий в культуре клеток в 95 (52,8 %) отмечено специфическое цитопатическое действие, характерное для различной степени репродуктивной активности возбудителя (3–6 lg ТЦД₅₀/мл). В 85 (47,2 %) образцах возбудитель *C. trachomatis* не был выявлен. Сопоставление результатов культурального

исследования и разработанной методики показало, что конъюгаты магнитных частиц позволяют селективно концентрировать возбудитель на “микрочипе”, как правило, только в тех биопробах (соскобном материале), в которых его наличие было подтверждено культуральным методом. Данные, полученные в испытании приведены в таблице.

Таблица — Результаты исследования биологических образцов на наличие *Chlamydia trachomatis* с использованием флуоресцентно-меченных иммуномагнитных частиц

Параметры		УГХ по данным культурального исследования		Всего
		имеется (n=95)	отсутствует (n=85)	
Результат исследования с помощью диагностической тест-системы «Набор реагентов для лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции с использованием флуоресцентно-меченных иммуномагнитных частиц (новый метод)	Chlamydia trachomatis выявлена «+»	истинно положительные (по новому методу) ИП=93	ложно-положительные (по новому методу) ЛП=4	Все пациенты с результатом «+» ИП+ЛП= 97
	Chlamydia trachomatis не выявлена «->»	ложно-отрицательные (по новому методу) ЛО=2	истинно отрицательные (по новому методу) ИО=81	Все пациенты с результатом «->» ЛО+ИО=83
Всего		ИП+ЛО=95	ЛП+ИО=85	ИП+ЛП+ЛО+ИО=180

Примечание: УГХ — урогенитальный хламидиоз

Как видно из представленных данных, только две пробы положительные в культуре клеток, дали отрицательный результат при использовании разработанного подхода, и поэтому он был интерпретирован как ложноотрицательный. Используя формулу $ДЧ = ИП / (ИП + ЛО) \times 100 \%$ (ИП — истинно положительные случаи, ЛО — ложноотрицательные результаты), был рассчитан показатель диагностической чувствительности, который составил 97,9 %. При исследовании всех образцов отрицательных в культуре клеток McCoу также получены сходные результаты в случае использования композиционных наночастиц. Диагностическая специфичность метода, рассчитанная по формуле $ДС = ИО / (ИО + ЛП) \times 100 \%$ (ИО — истинно отрицательные случаи, ЛП — ложноположительные результаты), равна 95,3 %. Точность метода определена, исходя из формулы $ДТ = (ИП + ИО) / (ИП + ЛП + ИО + ЛО) \times 100 \%$, и составила 96,7 %.

При обсуждении чувствительности и специфичности теста очевидно, что идеальным было бы если метод обладал 100 %-й чувствительностью и специфичностью. Однако на практике таких тестов нет. Попытки повысить

чувствительность теста, сопровождаются увеличением числа ложноположительных результатов, то есть снижением специфичности. И наоборот, повышение специфичности часто приводит к росту ложноотрицательных результатов и снижению чувствительности. При испытании инновационной диагностической тест-системы «Набор реагентов для лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции с использованием флуоресцентно-меченных иммуномагнитных частиц» получены достаточно высокие диагностические показатели ДЧ — 97,9 %, ДС — 95,3 % и ДТ — 96,7 %, что позволяет его рассматривать как перспективный для широкого практического применения.

Известно, что в лабораторной практике целый ряд факторов могут оказывать влияние на качество исследований и приводить к получению неправильных результатов. Одним из таких важных показателей является воспроизводимость теста, т.е. его способность одинаково измерять какие-либо параметры, явления, процессы, состояния в серии повторных измерений. При этом причины различий (вариабельности) показателей могут быть обусловлены как истинной (объективной, биологической), так и субъективной вариабельностью. В диагностике патогенных биологических агентов чаще встречаются случайные и систематические ошибки на преаналитическом и аналитическом этапах связанные с погрешностями персонала или самого теста (техники).

Для оценки степени воспроизводимости разработанного теста была проведена серия испытаний с одними и теми же пробами трехкратно в разные дни. Кроме того, в другой серии тестов одни и те же пробы исследовали разные специалисты. В проведенном исследовании процент проб, давших идентичные результаты составил 100 % и 97,2 % соответственно, что отвечает допустимым критериям (не менее 95 %). Следует отметить, что для того чтобы свести к минимуму субъективную вариабельность, соответствующий персонал, участвующий в проведении исследования, должен быть тщательно обучен. Подготовка персонала, прежде всего, предусматривает его обучение высококвалифицированными специалистами особенностям использования нового метода. Кроме обучения технике метода, персонал должен иметь представление относительно стандартных условий его применения, например, требованиям к исследуемому материалу, температуре помещения и т.д. при проведении исследований и другие важные аспекты.

Наряду с воспроизводимостью проанализированы и такие вторичные аналитические параметры как прогностическая ценность позитивных и негативных результатов. Прогностичность отрицательного и положительного результатов, рассчитанная в соответствии с формулами $(\text{ПЦОР} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛО}) \times 100 \%$ и $\text{ПЦПР} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛП}) \times 100 \%$ составили 97,6 % и 95,9 % соответственно.

Таким образом, проблему идентификации молекулярно-биологическими методами штаммов *C. trachomatis* с различными генетическими перестройками (лишенных плазмиды, с делецией в *orf3* плазмидном локусе) возможно решить с помощью разработанной тест-системы на основе иммуномагнитных (1 мкм) и флуоресцентных CdSe/ZnS наночастиц (2–3 нм). Ее использование позволяет эффективно выявлять как дикий, так и мутантные бесплазмидный и новый «шведский» штаммы патогена.

Заключение. Создана и налажен серийный выпуск отечественной тест-системы «Набор реагентов для лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции с использованием флуоресцентно-меченных иммуномагнитных частиц» (ТУ ВУ 100558032.335 — 2016). Тест-система обладает существенным преимуществом и позволяет селективно извлекать и концентрировать *C. trachomatis* из биологического материала, а наличие интенсивно-светящейся метки на поверхности магнитного носителя повышает чувствительность и специфичность флуоресцентного метода

исследования. Учитывая положительный опыт ее практического применения для диагностики *C. trachomatis* и основываясь на высоких показателях информативности индикации патогена: чувствительность — 97,9 %, специфичность — 95,3 %, точность — 96,7 % предлагается более широкое внедрение данной инновационной разработки в спектр методов лабораторной диагностики *C. trachomatis*.

Литература

1. Анализ заболеваемости урогенитальной хламидийной инфекцией в Республике Беларусь за период 2001–2015 гг. / Л. В. Рубаник [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. — 2017. — № 2. — С. 257–265.
2. Воронова, Е. А. Анализ информативности получаемого у мужчин биоматериала при исследовании на урогенитальные инфекции методом ПЦР / Е. А. Воронова, Е. В. Судоплатова, И. В. Никонорова // Молекулярная диагностика — 2017. — 2017. — № 1. — С. 350–351.1
3. Флуоресцентные полупродниковые нанокристаллы в микроскопии и цитометрии / И. Воробьев [и др.] // Цитология. — 2011. — Т. 53, № 5. — С. 392–403.
4. Нанотехнологические подходы для диагностики бактериально-вирусных инфекций / Н. Н. Полещук [и др.] // Наноиндустрия. — 2012. — № 5. — С. 48–54.
5. Индикация *Chlamydia trachomatis* с помощью иммуномагнитных флюоресцентных наночастиц при персистентной форме инфекции / Л. В. Рубаник [и др.] // Здравоохранение. — 2014. — № 10. — С. 54–58.
6. Nanoparticles for imaging and treating chlamydial infection : pat. US 8647673 / J. Panyam, J. A. Whittum-Hudson, A. P. Hudson. — Publ. date: 11.02.2014.
7. Rai, R., Bai J. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials / R. Rai, J. Bai // In: Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances: Proc. Conf., Spain / Ed. : A. Méndez-Vilas. — Formatex, Microbiology Series, 2012. — Vol. 1, N 3. — P. 197–209.
8. Методы микробиологической диагностики и лечения урогенитальных хламидиозов: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 10.02.1998 / Бел. науч.-исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии ; сост. : Л. П. Титов [и др.]. — Минск, 1998. — 34 с.

DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF THE TEST SYSTEM BASED ON COMPOSITE IMMUNOMAGNETIC AND FLUORESCENT CdSe/ZnS NANOPARTICLES FOR THE DETECTION OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN UROGENITAL CHLAMYDIA INFECTION

L.V. Rubanik, A.N. Astashonok, G.K. Zhavnerko, N.N. Poleshchuk

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

The practical application result of developed innovate test system with composite immunomagnetic (1 μm) and fluorescent nanoparticles (2–3 nm) for urogenital chlamydia infection laboratory diagnosis is presented. For the test system high informative indicators for *C. trachomatis* causative agent were obtained: sensitivity — 97.9 %, specificity — 95.3 %, and accuracy — 96.7 %. The introduction of this diagnostic test system into the clinical diagnostic laboratories work in the country is suggested.

Keywords: urogenital chlamydia, diagnostic test-system, fluorescent CdSe/ZnS nanoparticles, sensitivity, specificity.

Поступила 28.08.2017

ТУБЕРКУЛЕЗНОЕ ПОРАЖЕНИЕ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Г.В. Тищенко

*ГУЗ «Гомельское областное клиническое патологоанатомическое бюро»,
Гомель, Беларусь;*

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Резюме. Проведено морфологическое исследование регионарных лимфатических узлов легких и средостения, забранных при патологоанатомическом вскрытии 19 ВИЧ-инфицированных пациентов с установленным туберкулезным поражением лимфоузлов. В 52,6 % туберкулезный процесс морфологически проявлялся наличием туберкулоидных гранулем с казеозным некрозом и многоядерными клетками Пирогова-Лангханса, в 47,4 % — казеозным некрозом с минимальным количеством эпителиоидных клеток по периферии некрозов и без многоядерных клеток. В группе пациентов, получавших антиретровирусную терапию (АРТ) соотношение случаев продуктивной к альтеративной воспалительной реакции составило 3:1, у пациентов без АРТ — 0,6:1, что является морфологическим подтверждением повышения резистентности организма и проявлением адекватной иммунной реакции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, туберкулез, лимфоузлы, морфология, АРТ.

Введение. Туберкулез, возбудитель которого обладает лимфотропизмом, является наиболее частым представителем оппортунистических инфекций (ОИ) у ВИЧ-инфицированных пациентов [1]. При иммунодефиците, вызываемом ВИЧ, туберкулез имеет тенденцию к генерализации, нередко поражает регионарные лимфоузлы легких и средостения, а также других групп при генерализации процесса [2, 3]. При отсутствии надлежащего лечения, до 90 % ВИЧ-инфицированных пациентов погибают в течение нескольких месяцев после заражения туберкулезом [1].

Гистоморфологические проявления туберкулезного воспаления при ВИЧ-инфекции обнаруживают явную корреляцию с количеством CD4-лимфоцитов в крови. По мере падения их уровня в пораженном органе начинают реже встречаться, а затем исчезают типичные туберкулезные гранулемы, в них отсутствуют многоядерные клетки Пирогова-Лангханса, значительно уменьшается количество эпителиоидных клеток, а неполноценность функции макрофагов выражается в неспособности формировать специфические гранулемы [4].

Цель работы — установить частоту и особенности туберкулезного поражения лимфатических узлов (ЛУ) у ВИЧ-инфицированных пациентов при гистологическом исследовании секционного материала с учетом назначения антиретровирусной терапии (АРТ).

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были регионарные лимфатические узлы легких и средостения, взятые при патологоанатомическом вскрытии 19 ВИЧ-инфицированных пациентов Светлогорского района Гомельской области за 2012–2014 года с установленным туберкулезным поражением ЛУ. Критерием туберкулезного поражения была визуализация туберкулоидных гранулем с казеозным некрозом в тканях ЛУ. ЛУ подвергались стандартной процедуре гистологической обработки. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином, по Циль-Нильсену, по Романовскому-Гимзе.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием STATISTICA 10.0 (SNAXAR207F394425FA-Q).

Результаты исследования и обсуждение. У всех 19 пациентов была 4 клиническая стадия ВИЧ-инфекции (СПИД).

Из 19 пациентов 11 (57,9 %) были мужского пола и 8 (42,1 %) — женского.

Пациенты с туберкулезом ЛУ умирали в возрасте от 26 до 55 лет: от 26 до 29 лет — 4 (21,1 %) пациента, от 30 до 39 лет — 11 (57,9 %) пациентов, от 40 до 49 лет — 2 (10,5 %) пациента, от 50 до 59 лет — 2 (10,5 %) пациента. Таким образом, среди умерших подавляющее большинство составляли молодые люди до 39 лет (15 человек, 79,0 % от общего количества). Медиана возраста составила 37 (32; 39) лет.

В 5 (26,3 %) случаях имела место впервые выявленная ВИЧ-инфекция, что не позволило достоверно установить стаж инфицирования ВИЧ-инфекцией. Среди остальных 14 пациентов стаж инфицирования ВИЧ-инфекцией варьировался в диапазоне от 2 до 17 лет, медиана стажа инфицирования среди вышеупомянутых 15 пациентов составила 7,5 (3; 15) лет.

У всех 19 (100 %) пациентов с туберкулезом ЛУ, морфологически было подтверждено микобактериальное поражение легких, в 14 (73,7 %) случаях выявлена генерализованно-диссеминированная форма туберкулеза, также выявлено по 5 (26,3 %) случаев туберкулезного плеврита и перитонита, и 8 (42,1 %) случаев туберкулезного менингоэнцефалита. У 3 (15,8 %) пациентов не было выявлено других очагов поражения, кроме легких и паратрахеальных ЛУ.

Клинически иммунный статус и вирусная нагрузка определялась в 10 (52,6 %) случаях. У всех пациентов количество CD4+ Т-лимфоцитов было крайне низким — менее 200 клеток на 1 мкл крови (медиана составила 64 (30,25; 113) клеток/мкл), а уровень вирусной нагрузки наоборот был высокий — от 213913 до 2152144 копий РНК ВИЧ в 1 мкл крови (медиана составила 800000 (664553; 1836097) копий/мкл).

АРТ проводилась 8 (42,1 %) пациентам.

При гистологическом исследовании ЛУ типичная продуктивная воспалительная реакция практически наблюдалась в 10 (52,6 %) случаях, морфологически она проявлялась наличием туберкулоидных гранул с казеозным некрозом в центре и макрофагальной инфильтрацией, эпителиоидными клетками и многоядерными клетками Пирогова-Лангханса по периферии некроза. В 9 (47,4 %) случаях наблюдался казеозный некроз с минимальным количеством эпителиоидных клеток по периферии некрозов и без многоядерных клеток, что является характерно для альтеративной формы воспалительного ответа.

При анализе характера воспалительной реакции в корреляции с назначением АРТ отмечалась тенденция нарастания соотношения продуктивной реакции при приеме АРТ. Так, среди 8 пациентов, получавших АРТ, в 6 случаях были обнаружены типичные гранулемы, в 2 случаях — казеозные некрозы без продуктивной реакции. В 11 случаях, когда АРТ не назначалась продуктивная воспалительная реакция была выявлена в 4 случаях, у 7 пациентов в ЛУ преобладала альтеративная воспалительная реакция (таблица).

Таблица — Альтеративная и продуктивная формы туберкулеза в корреляции с АРТ.

	Альтеративная форма воспаления	Продуктивная форма воспаления	Всего
АРТ проводилась	2 (10,5 %)	6 (31,6 %)	8 (42,1 %)
АРТ не проводилась	7 (36,8 %)	4 (21,1 %)	11 (57,9 %)
Всего	9 (47,3 %)	10 (52,7 %)	19 (100 %)

Выводы. В группе пациентов, получавших АРТ соотношение случаев продуктивной к альтеративной воспалительной реакции равняется 3:1, а у пациентов, не получавших АРТ то же соотношение 0,6:1, что является морфологическим подтверждением повышения резистентности организма и проявлением адекватной

иммунной реакции. При туберкулезном поражении ЛУ АРТ является эффективным методом купирования специфического процесса.

Литература

1. Harries, A. World Health Organization. TB/HIV: a clinical manual / A. Harries, D. Maher, S. Graham. — Geneva: WHO, 2004. — 36 pp.
2. Kradin, R. L. Diagnostic pathology of infectious disease / ed.: R. L. Kradin. — Philadelphia, PA, 2010. — P. 314, 572–574.
3. Joachim's Lymph Node Pathology / eds.: L. H. Joachim, L. J. Medeiros. — 4th ed. — Philadelphia: JB Lippincott Co, 2008. — P. 147–149.
4. Мишин, В. Ю. Туберкулез при ВИЧ-инфекции / В. Ю. Мишин, М. Д. Карачунский // Медицинская газета (М.). — 2003. — Вып. № 15. С. 1–12.

TUBERCULOSIS OF LYMPHATIC NODES AMONG HIV-INFECTED PATIENTS

G. V. Tishchenko

*Gomel Regional Clinical Bureau of Pathology, Gomel;
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

Morphological examination of regional lymph nodes of lungs and mediastinum taken during autopsy of 19 HIV-infected patients with tuberculosis of lymph nodes was carried out. In 52.6 % of the tuberculosis process was morphologically manifested by the presence of tuberculoid granulomas with caseous necrosis and Langhans giant cells, 47.4 % by caseous necrosis with a minimal amount of epithelioid cells along the periphery of necrosis and without giant multinucleated cells. In the group of patients receiving antiretroviral therapy (ART), the ratio of cases of productive to alterative inflammatory reaction was 3:1, in patients without ART — 0.6:1, which is a morphological confirmation of the increase in resistance of the body and the appearance of an adequate immune response.

Keywords: HIV infection, tuberculosis, lymph nodes, morphology, ART.

Поступила 07.08.2017

РАСПРОСТРАНЕНИЕ НЕКРОБАКТЕРИОЗА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

А.Ю. Финогенов, Е.Г. Финогенова

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», Минск, Беларусь

Резюме. При исследовании животных с гнойно-некротическими поражениями копыт возбудитель некробактериоза *Fusobacterium necrophorum* обнаружен в 71,4 % хозяйств и в 41,0 % исследуемых проб (в ПЦР). Гнойно-некротические поражения копыт имеют полиэтиологическую структуру, наряду с *F. necrophorum* выделяются *Bacteroides ovatus*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*

Ключевые слова: крупный рогатый скот, некробактериоз, *Fusobacterium necrophorum*.

Введение. Крупный рогатый скот по всему миру страдает от инфекционных заболеваний копыт, а в особенно сильно это отражается на высоко продуктивных породах молочных коров. Эти заболевания имеют заметный эффект на прибыльности

именно молочных ферм. Удой коров при этом снижается на четверть. По всему миру 60 % высоко производительных коров страдают от какого-либо типа инфекционных заболеваний копыт. По данным 25 % животных из числа поступающего импортного скота выбывают из стада через 5—7 месяцев после завоза по причине болезней опорно-двигательного аппарата [1]. Заболевания копыт в Германии «обходятся» более чем в 100 млн. евро в год [2]. По данным британских исследователей, они составляют 27 % потерь по причине нарушения здоровья и по этому показателю занимают второе место после мастита [3].

В практике, как правило, заболевания копыт, возникают в результате совместного воздействия нескольких факторов.

В животноводстве Республики Беларусь возникла достаточно серьезная проблема с заболеваемостью копыт крупного рогатого скота, особенно у высокопродуктивных животных.

Во многом патология заболеваний конечностей у крупного рогатого скота связана с некробактериозом. К настоящему времени установлено, что некробактериоз крупного рогатого скота это — инфекционная болезнь, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями, лаказующимися преимущественно на дистальных частях задних конечностей, а в отдельных случаях — в ротовой полости, на половых органах, вымени, в печени, легких мышцах и других тканях и органах. Заболеванию свойственна стационарность, до 40 % коров в неблагополучном стаде приходится выбраковывать по причине некробактериоза [4].

Болезнь наносит неблагополучным хозяйствам большой экономический ущерб. По сообщениям [5], в процессе переболевания коровы теряют 30–40 % массы тела и до одной тонны молока.

В характеристике инфекционного процесса при некробактериозе отмечается его зависимость, в первую очередь, от иммунного статуса организма животных, условий их содержания и кормления, вирулентности возбудителя, анаэробных условий для его развития в организме и наличия в месте патологического процесса ассоциации патогенной и условно-патогенной микрофлоры, участвующей в развитии этого процесса [6].

Лечение больных некробактериозом животных должно быть комплексным и включать обязательно ортопедическую обработку копыт. Антибиотикотерапия при этой болезни должна сопровождаться определением чувствительности к антибиотикам не только *Fusobacterium necrophorum*, но и ассоциации микроорганизмов, участвующих в инфекционном процессе [7].

Оценка распространения некробактериоза в Республике Беларусь затруднена в связи с тем, что возбудитель данного заболевания (*F. necrophorum*) является строгим анаэробом, а в условиях районных, а зачастую и областных, ветеринарных лабораторий не имеется достаточной материальной и практической базы для работы с анаэробами. Отсюда большое число не выделения этого микроорганизма из патологического материала. И как следствие, заниженная информация по распространению некробактериоза коров на территории РБ.

Целью работы являлось изучить распространение некробактериоза на территории Республики Беларусь с использованием бактериологического метода и полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

Материалы и методы исследования. Анализ эпизоотической ситуации по некробактериозу осуществляли на основании данных ветеринарной отчетности Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь и ветлабораторий республики, а также собственных исследований.

Бактериологические исследования патматериала проводили от больных животных с признаками гнойно-некротических поражений копыт в анаэробных условиях с использованием анаэростана с газогенерирующими системами. При проведении исследований опирались на следующие нормативные документы.

— Методические указания по бактериологической диагностике некробактериоза животных Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 22.07.2008 (№ 10–1–5/675)

— Методические указания по биологическому методу в диагностике бактериальных инфекций Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 10.04.2007 (№ 10–1–5/307)

— Методические указания по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 17.12.2007 (№ 10–2–5/1112)

Типирование выделенных штаммов бактерий проводили с использованием диагностического прибора VITEK 2 фирмы BIOMERIEUX в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.

Для бактериологической диагностики некробактериоза биоматериал (пораженная фаланга) брали от животных в хозяйствах с выраженными клиническими признаками, абсцессы печени отбирали при убое животных на мясокомбинате. Диагностика некробактериоза включала микроскопию мазков из патологического материала, посеvy на питательные среды и заражение лабораторных животных. В качестве питательных сред использовали среду Китта-Тароцци, аминокровин-сывороточный бульон, мясопептонный бульон.

Параллельную пробу материала исследовали методом ДНК- технологии по ниже приведенной методике.

Выделение ДНК *F. necrophorum* из биологических образцов. Из фрагмента соскоба с пораженного участка копыт готовили 20 % суспензию на 0,9 % NaCl. Далее к 50 мкл суспензии добавляли 500 мкл подогретого 10 % СТАВ, перемешивали и инкубировали при 80°C в течение 2 часов. Затем добавляли в половинном объеме смеси: фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) и центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин. Водную фазу переносили в другую пробирку и прибавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия рН 4,8 и 2 объема этанола и выдерживали 40 минут или ночь при -20°C. Преципитат ДНК осаждали скоростным центрифугированием. Осадок ДНК растворяли в 20–30 мкл стерильной бидистиллированной воды или 10 mM TE-буфере рН 8,0.

Полимеразную цепную реакцию проводили в течение 27 циклов в следующем режиме: предварительный нагрев ДНК при 95°C в течение 3,0 мин — 1 цикл; далее 25 циклов по три сегмента в каждом: денатурация ДНК при 94°C в течение 0,3 мин, гибридизация при 56°C в течение 0,4 мин, элонгация при 72°C в течение 0,5 мин и 1 цикл — досинтез при 72°C в течение 1,2 мин. О положительном результате анализа судили, сопоставляя к размеру в положительном контроле ДНК, которые должны совпадать.

Для бактериологической диагностики некробактериоза биоматериал (пораженная фаланга) брали от животных в хозяйствах с выраженными клиническими признаками, абсцессы печени отбирали при убое животных на мясокомбинате. Диагностика некробактериоза включала микроскопию мазков из патологического материала, посеvy на питательные среды и заражение лабораторных животных. В качестве питательных сред использовали среду Китта-Тароцци, аминокровин-сывороточный бульон, мясопептонный бульон.

По окончании исследований проводили сравнение полученных результатов бактериологической диагностики с методом ПЦР.

Результаты исследования. В ходе наших исследований было определено несколько разных видов бактерий, которые являются потенциальными агрессорами против копыт и ног коров. Установлено, что в патологическом процессе на коже вокруг копыта, участвует группа из нескольких разных бактерий.

При исследовании объектов внешней среды (таблица 1) были выделены микроорганизмы родов *Bacillum*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, являющиеся осложняющей микрофлорой при копытной гнили.

Таблица 1. — Культуры, выделенные из объектов внешней среды на молочно-товарной ферме

Пробы	Аэробные микроорганизмы	Анаэробные микроорганизмы
Сенаж	<i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Bacillum sp.</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>
Земля с выгона	<i>Bacillum sp.</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i> <i>Bacteroides ovatus</i>
Фекалии со стока	<i>Bacillum sp.</i>	нет
Подстилка	<i>Staphylococcus gallinarium</i> , <i>Bacillum sp.</i>	нет

При исследовании мест поражений копытного рога были выделены аэробные и анаэробные сапрофитные и условно патогенные микроорганизмы (таблица 2).

Таблица 2. — Культуры, выделенные из пораженного копытного рога коров

Наименование хозяйства	Аэробные микроорганизмы	Анаэробные микроорганизмы
МТФ Атолино, РУЭО СХП «Восход» Минского района	<i>Streptococcus faecalis</i> . <i>Proteus sp.</i> , <i>E.coli</i>	<i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Clostridium clostridioforme</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Cupriavidus pauculus</i>
Экспериментальное хозяйство «Руткевичи» Щучинского района, Гродненской области	<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Proteus sp.</i> , <i>E.coli</i>	<i>Cupriavidus pauculus</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Clostridium clostridioforme</i>

По анализу состояния копыт на МТФ Атолино РУЭО СХП «Восход» содержится 642 головы дойного стада. Помещение 1 — 316 коров, помещение 2 — 326 коров. Содержание беспривязное, животные разделены на секции.

В обоих коровниках патология копыт отмечалась у 110 коров 1 коровника (34,8 %) и у 143 коров 2 коровника (43,8 %). За время исследований число коров, нуждавшихся в лечении копыт в первом коровнике, составило — 178 голов, а во втором коровнике — 127. В хозяйстве используют 10 % раствор медного купороса.

По анализу состояния копыт на МТК «Зайцева слобода» СПК «Звезда-агро» Кричевского района Могилевской области., содержится 950 голов крупного рогатого скота из них: 791 дойное стадо, нетели 58, откорм 5, 96 телят. Содержание беспривязное, животные разделены на секции. Общий анализ состояния конечностей коров принадлежащих МТФ Атолино РУЭО СХП «Восход», МТК «Зайцева слобода» СПК «Звезда-агро» Кричевского района Могилевской области представлен в таблице 3.

Таблица 3. — Общий анализ по стаду

Наименование показателя	МТФ Атолино РУЭО СХП «Восход»	МТК «Зайцева слобода» СПК «Звезда-агро»
Общее количество животных	642	791
Нуждаются в обрезке копыт	253 (39,4 %)	315 (39,8 %)
Деформация рога	62 (9,6 %)	68 (8,6 %)
Межпальцевый дерматит	53 (8,2 %)	63 (7,9 %)
Болезнь Мортелларо	56 (8,7 %)	38 (4 %)
Воспаление венчика	15 (2,3 %)	2 (0,25 %)
<i>Бальная оценка хромоты животных по стаду:</i>		
1 балл	520 (80,9 %)	675 (85,3 %)
2 балла	77(11,9 %)	78(9,8 %)
3 балла	24(3,73 %)	36(4,55 %)
4 балла	3(0,46 %)	2(0,25 %)
Животных с хромотой, оцениваемой в 5 баллов, выявлено не было.		

Процент выбытия коров по болезням конечностей составляет 50–60 % от общего числа выбывших животных.

Результаты исследования патологического материала от коров с гнойно-некротическим поражением копыт из 14 хозяйств РБ представлены в таблице 4.

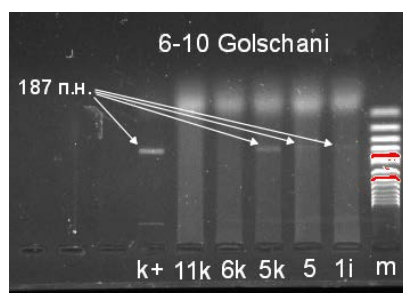
Таблица 4. — Результаты бактериологического исследования патологического материала от коров

№ пп	Название хозяйства	Выделенные штаммы
1.	ОАО «1-я Минская птицефабрика» а.г. Большевик Минского района	<i>p. Bacillus, p. Proteus, p. Bacteroides</i>
2.	ОАО «Комайский-Агро» Постаковского района, Витебской области.	<i>Streptococcus bovis, Fusobacterium necrophorum, Proteus spp., Staphylococcus lentus</i>
3.	СПК «Агрокомбинат «Снов», Минская область, Несвижский район.	<i>Bacteroides ovatus, Clostridium perfringens, Streptococcus spp., Staphylococcus simulans, Fusobacterium necrophorum</i>
4.	Можейково Гродненской области	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
5.	Новый век Гродненской области	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
6.	Баума Гродненской области	<i>Fusobacterium necrophorum Staphylococcus spp., Streptococcus spp.</i>
7.	Эгерды Гродненской области	<i>Fusobacterium necrophorum, Staphylococcus spp., Streptococcus spp.</i>
8.	Даунары Гродненской области	<i>Fusobacterium necrophorum, Clostridium spp.</i>
9.	Василишки Гродненской области	<i>Proteus, Bacillus, Staphylococcus spp, Streptococcus spp., Clostridium, Fusobacterium necrophorum</i>
10.	Песчанка Гродненской области	<i>Fusobacterium necrophorum, Bacteroides spp, Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Clostridium, Proteus</i>
11.	РСУП «Совхоз Лидский», Лидский район, Гродненская область	<i>Bacteroides ovatus, staphylococcus spp., Streptococcus spp., Proteus spp., Diplococcus</i>

12.	СПК «Гольшанский»	<i>Veillonella spp.</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
13.	ОАО «Иванский - Агро»	<i>Clostridium spp.</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Proteus spp.</i>
14.	Филиал ОАО «БелАЗ» - СПК «Первомайский» Минской обл.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i>

Таким образом, возбудитель некробактериоза *F. necrophorum* был обнаружен в 71,4 % случаев. Гнойно-некротические поражения копыт имели полиэтиологическую структуру, наряду с *F. necrophorum* выделялись *Bacteroides ovatus*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*

Выделенные штаммы *F. necroforum* идентифицировали в полимеразной цепной реакции (рисунок).



1. К+ Положительный контроль ДНК *Fusobacterium necroforum* (АТСС);
2. 11 К, 6К, 5К, 5, 1i. Исследуемая проба ДНК, выделенная из смеси культур (гнойно-некротический очаг) выделенная на среде накопления;
3. М — маркер (сверху: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 п.н. и т.д.)

Рисунок — Идентификация выделенных штаммов *F. Necroforum* в полимеразной цепной реакции

Как видно из представленного рисунка исследуемая проба 5К, 5 и 1i после проведения ПЦР и детекции в электрофоретическом геле дали четкие линии свечения на уровне положительного контроля. Длина специфического фрагмента составляет 187 п.н., что соответствует маркеру на том же уровне (линия находится между полосами маркера 150–200 п.н.). Пробы 11К, 6К — отрицательные.

Заключение. При исследовании животных с гнойно-некротическими поражениями копыт возбудитель некробактериоза *F. necrophorum* обнаружен в 71,4 % хозяйств и в 41,0 % исследуемых проб (в ПЦР). Гнойно-некротические поражения копыт имеют полиэтиологическую структуру, наряду с *F. necrophorum* выделяются *Bacteroides ovatus*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*

Литература

1. Комплексная система мероприятий — основной путь борьбы с некробактериозом животных / А. А. Плохова [и др.] // Ветеринария. — 2007. — № 4. — С. 9–11.
2. The two major subspecies of *Fusobacterium necrophorum* have distinct leukotoxin operon promoter regions / F. Zhang [et al.] // Vet. Microbiol. — 2006. — Vol. 112, No. 1. — P. 73–78.

3. Narongwanichgarn, W. Differentiation of *Fusobacterium necrophorum* subspecies from bovin pathological lesions by RAPD-PCR / W. Narongwanichgarn, E. Kawaguchi, N. Misawa // *Vet. Microb.* — 2001. — Vol. 82, No. 6. — P. 383–388.

4. Проблемы борьбы с некробактериозом: заблуждения и реальность / А. Сидорчук [и др.] // *Ветеринария.* — 2006. — № 2. — С. 5–6.

5. Опыт борьбы с некробактериозом животных / Ю. Д. Караваев [и др.] // *Ветеринария.* — 2003. — № 7. — С. 7–9.

6. Современные методы и средства диагностики, лечения и профилактики некробактериоза животных / А. А. Плохова [и др.] // *Ветеринарный врач (Казань).* — 2007. — № 1. — С. 10–13.

7. Соломаха, О. И. Некробактериоз комплексное решение проблемы / О. И. Соломаха, Л. В. Кириллов // *Аграрная Россия.* — 2001. — № 3. — С. 38–41.

DISTRIBUTION OF NECROBACTERIOSIS IN AGRICULTURAL ORGANIZATIONS OF THE REPUBLIC OF BELARUS

A.Yu. Finogenov, E.G. Finogenova

The S.N. Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Belarus

In the study of animals with purulent necrotic lesions of the hooves, the causative agent of necrobacterium *Fusobacterium necrophorum* was detected in 71.4 % of farms and in 41.0 % of the samples under study (in PCR). Purulent necrotic lesions of hoofs have a polyetiological structure; *Bacteroides ovatus*, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp along with *F. necrophorum* are isolated.

Keywords: cattle, necrobacteriosis, *Fusobacterium necrophorum*.

Поступила 18.09.2017

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОТИПОВ ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ *cagPAI* *HELICOBACTER PYLORI* У ПАЦИЕНТОВ С ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗОМ

О.О. Янович¹, М.В. Дорошко²

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

²Медицинский центр «Нордин», Минск, Беларусь

Резюме. Целью работы была оценка разнообразия генотипов острова патогенности *cagPAI Helicobacter pylori* у пациентов с хеликобактериозом. Полученные данные указывают на наличие связи генов острова патогенности *H. pylori* с развитием неблагоприятного течения хеликобактериоза. Установлено, что наличие гена *CagT* увеличивает развитие язвы ДПК в 5,8 раза, гена *CagH* — в 3,7 раза.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, гены острова патогенности.

Введение. *Helicobacter pylori* имеет широкий набор факторов патогенности, которые обеспечивают выживание патогена в кислой среде желудочного содержимого и колонизацию слизистой оболочки.

Остров патогенности *cagPAI* играет важную роль в патогенезе хеликобактериоза, поскольку кодирует белковые компоненты сложной специализированной

макромолекулярной транспортной системы секреции IV типа (T4SS), в том числе хорошо изученный маркер — белок *cagA* [1].

Система секреции IV типа необходима для транспорта *CagA* и клеточного компонента бактериального пептидогликана, в эпителиальные клетки желудка, что вызывает изменения в проведении клеточного сигнала. Система *cag* T4SS также стимулирует высвобождение провоспалительных цитокинов в слизистой оболочке желудка, включая интерлейкин-8 (ИЛ-8) [2].

В связи с вышеизложенным наличие *cagPAI* является отличительной чертой вирулентных штаммов *H. pylori*, поскольку вызывает хроническое воспаление слизистой оболочки желудка и изменения в проведении сигнала в клетках, связанные с канцерогенезом желудка [3].

Регион *CagPAI* длиной 37–40 кб кодирует 27 белков и включает в себя две области: правую *cag* I и левую *cag* II, состоит из 30 генов.

Белок *CagM* является важным компонентом необходимым для функционирования T4SS. *CagM* выявляется как поверхностный белок, связанный с *cagT* [4].

Исследования показали, что изоляты *H. pylori*, у которых не определяется ген *cagM*, являются дефектными и не могут переносить *CagA* или индуцировать секрецию ИЛ-8 в клетках желудка хозяина [5, 6].

Белок *CagH* необходим для транслокации *CagA* и секреции ИЛ-8 в клетках-мишенях [7]. *CagH* регулирует количество пилей, которые образуются во время взаимодействия между бактериями и хозяином [8].

Белок *cagG* состоит из 142 аминокислот. Установлено, что штаммы *H. pylori* мутантные по *cagG* не способны переносить *CagA* в эпителиальные клетки желудка, но сохраняют способность индуцировать секрецию ИЛ-8 [9]. Интересно отметить, что хотя *cagG* и *cagH* экспрессируются одновременно нет доказательств, что их продукты взаимодействуют между собой [10].

Продуктом гена *cagE* является белок, который вызывает перестройку цитоскелета клеток желудка, активацию ядерного фактора NF- κ B и секрецию ИЛ-8 [11]. Кроме того, *CagE* ингибирует транскрипцию α -субъединицы H, K-АТФазы париетальных клеток, что приводит к гипохлоргидрии и повышенному риску развития рака желудка [12]. По данным некоторых авторов *CagE* имеет связь с более тяжелым клиническим исходом хеликобактериоза [13, 14]. С другой стороны, в Восточной Азии, почти все штаммы *H. pylori* имеют ген *cagE* несмотря на клиническое проявление инфекции [15].

Целью работы было оценить разнообразие генотипов острова патогенности *cagPAI* *H. pylori* у пациентов с хеликобактериозом.

Материалы и методы. Было проведено обследование 67 Нр-положительных пациентов (37 женщин и 30 мужчин), обращавшихся в медицинский центр «Нордин» г. Минска с целью эндоскопического исследования желудочно-кишечного тракта. Средний возраст составил $41,5 \pm 1,5$ лет. Материалом для исследования служили биоптаты слизистой оболочки желудка антрального отдела, полученные во время фиброгастродуоденоскопии. Наличие *H. pylori* в биоптате было подтверждено гистологическим исследованием и молекулярно-генетическим методом ПЦР в режиме реального времени. Верифицирование *H. pylori* проводили непосредственно в биопсийном материале с помощью ПЦР.

Детекция генов острова патогенности методом ПЦР. Для определения генов острова патогенности было выполнено ПЦР с использованием пяти пар олигонуклеотидных праймеров специфических для генов *cagA*, *cagM*, *cagT*, *cagH* и *cagE*. Амплификацию проводили в автоматическом режиме по заданным программам. Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

Статистическая обработка данных. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение и доли от общего числа. Для сравнения долей применялся анализ таблиц сопряженности с вычислением статистик связи (с поправкой Йэйтса) и точный критерий Фишера, ОШ — соотношение шансов (STATISTICA 8.0). Разница считалась достоверной при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Все обследованные пациенты были разделены на четыре группы в зависимости от диагноза: пациенты с поверхностным гастритом (ПГ) ($n = 31$), с атрофическим гастритом (АГ) ($n=11$), с эрозивным гастритом (ЭГ) ($n=11$), с язвой двенадцатиперстной кишки (язва ДПК) ($n=14$).

Частота встречаемости генов острова патогенности у пациентов разных групп представлена на рисунке 1.

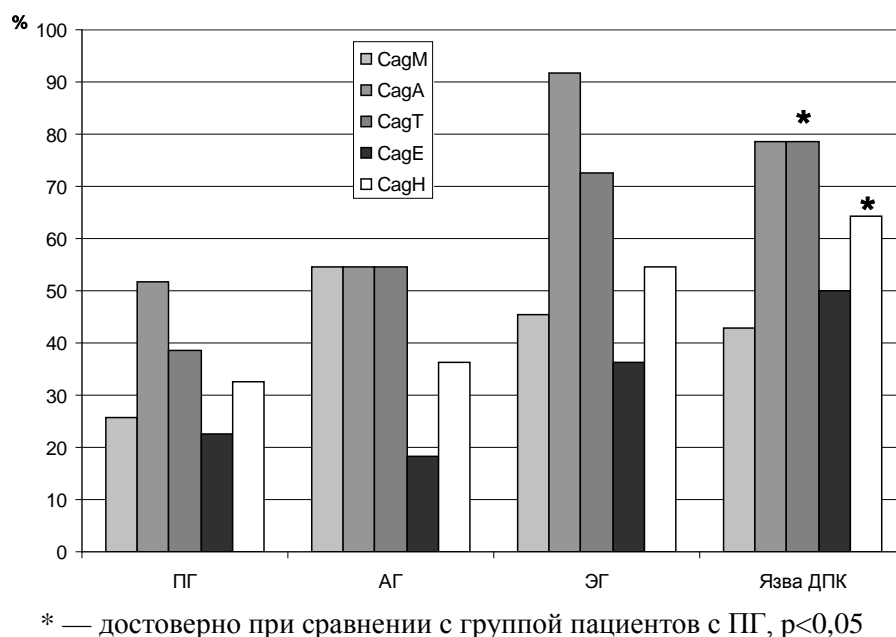


Рисунок 1 — Частота встречаемости генов острова патогенности HP у пациентов с хеликобактериозом в зависимости от заболевания

Среди пациентов с АГ частота встречаемости генов CagM, CagA и CagT не отличалась и составила 54,5 %. С меньшей частотой встречается ген CagE — 18,2 %.

По литературным данным наличие главного гена острова патогенности CagA не указывает на полное функционирование всех локусов [16]. Исследования других генов *sa*-PAI помогают понять их вклад в интенсивность патологического процесса хеликобактериоза.

В нашей работе выявлено, что в группе пациентов с ПГ с наибольшей частотой встречается ген CagA — 51,6 %. В группе пациентов с язвой ДПК частота встречаемости генов CagT и CagH достоверно выше при сравнении с пациентами с ПГ. Методом логистической регрессии установлено, что ОШ в отношении CagT составляет 5,8, наличие гена CagH увеличивает риск развития язвы ДПК в 3,7 раза.

Японские исследователи Т. Ikenoue с соавт. предложили принять за маркер наличия *sa*-PAI ген *sa*E [15]. Однако, наши исследования, как и работа Р. I. Hsu из США не подтверждают эту гипотезу [17]. В работе Р. I. Hsu наиболее часто встречающимся геном был *sa*G, в нашем исследовании — сочетание генов *sa*A и *sa*T. Можно предположить, что выбор маркерного гена острова патогенности зависит от региона, в котором проводится исследование.

Важное значение имеет сочетание генов острова патогенности и наличие всех пяти исследуемых локусов. Необходимо отметить что в группе пациентов с АТ были выявлены штаммы НР у которых отсутствуют все пять исследуемых генов (рисунок 2), что достоверно ниже при сравнении с пациентами с язвой ДПК (35,7 %, $p < 0,05$).

Отсутствие генов острова патогенности отмечено только у 14,3 % пациентов группы с язвой ДПК.

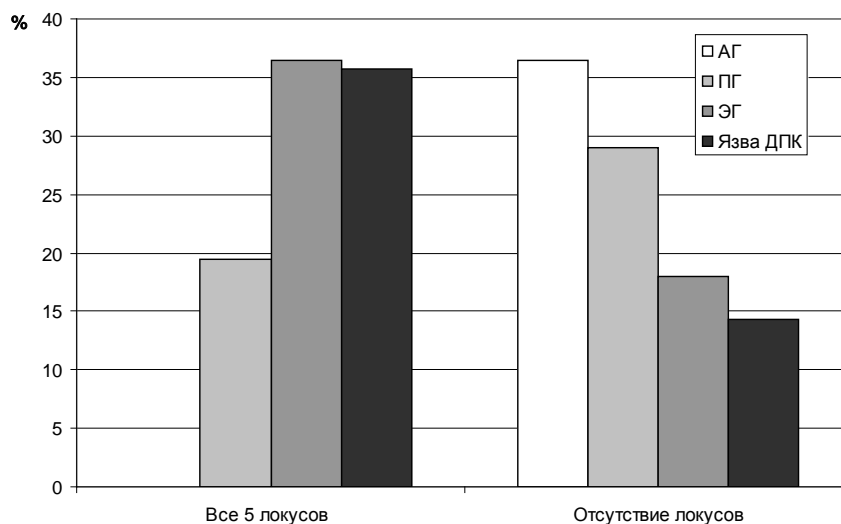


Рисунок 2. — Частота встречаемости всех локусов острова патогенности НР у пациентов с хеликобактериозом в зависимости от заболевания

Maeda с соавт. [16] исследовали частоту генов *cagPAI* и показали, что штаммы с полным набором локусов связаны с развитием язвенной диспепсии. Эти результаты подтверждаются в нашем исследовании, где выявлено, что наличие всех пяти генов *cagPAI* чаще выявляется у пациентов с эрозивным гастритом и язвой ДПК.

Таким образом, гены *CagPAI* имеет большое влияние на течение воспалительного процесса при хеликобактериозе. Структурный анализ генов острова патогенности показал, что он подвержен различным генетическим перестройкам влияние которых на течение хеликобактериоза не совсем ясно. Исследования о влиянии факторов вирулентности *H. pylori* на течение заболевания будут продолжены в дальнейших исследованиях.

Литература

1. Backert, S. The role of CagA in the gastric biology of *Helicobacter pylori* / S. Backert, M.J. Blaser // *Cancer Res.* — 2016. — Vol.76. — P.203–222.
2. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein / S. Brandt [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2006. — Vol.102. — P.9300–9305.
3. Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis / M. Hatakeyama // *Cell Host Microbe.* — 2014. — Vol.15. — P.306–316.
4. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies/ S. Kutter [et al.] // *J Bacteriol.* — 2008. Vol.190. — 2161–2171.
5. Protein-protein interactions among *Helicobacter pylori* cagproteins / V.J. Busler [et al.] // *J Bacteriol.* — 2006. — Vol.188. — P.4787–4800.
6. Genes required for assembly of pili associated with the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system / E.M. Johnson [et al.] // *Infect Immun.* — 2014. — Vol.82. — P.3457–3470.
7. Characterization of peptidoglycan hydrolase in Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* / Q. Zhong [et al.] // *Mol Biol Rep.* — 2011. — Vol.38. — P. 503–509.

8. *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface / C.L. Shaffer [et al.] // PLoS. — 2011. — Pathog.7, e1002237.
9. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8 / W. Fischer [et al.] // Mol Microbiol. — Vol.42. — P. 1337–1348.
10. CagI is an essential component of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system and forms a complex with CagL / K.T. Pham [et al.] // PLoS. — 2011. — ONE7, e35341.
11. Su, B. Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection / B. Su, P.J. Ceponis, P.M. Sherman // J. Med. Microbiol. — 2003. — Vol.52. — P.861–867.
12. *Helicobacter pylori* represses proton pump expression and inhibits acid secretion in human gastric mucosa / A. Saha [et al.] // Gut. — 2010. — Vol.59. — P.874–881.
13. The relationship between *Helicobacter pylori* genes cagE and virB11 and gastric cancer / V.P. Lima [et al.] // Int. J. Infect. Dis. — 2010. — Vol.14. — P.613–617.
14. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients / C. Chomvarin [et al.] // Int. J. Infect. Dis. — 2008. — Vol.12. — P.30–36.
15. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the cag pathogenicity island / T. Ikenoue [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2001. — Vol.8. — P.181–186.
16. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates / S. Maeda [et al.] // Gut. — 1999. — Vol.44. — P.336–341.
17. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island / P.I. Hsu [et al.] // Am J Gastroenterol. — 2002. — Vol.97. — P.2231–2238.

DIVERSITY WITHIN THE *HELICOBACTER PYLORI* CAG PATHOGENICITY ISLAND IN PATIENTS WITH HELICOBACTERIOSIS

O.O. Yanovich¹, M.V. Doroshko²

¹*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;*

²*Nordin Medical Center, Minsk, Belarus*

The aim of the study was to assess the diversity within the *Helicobacter pylori* Cag pathogenicity island in patients with helicobacteriosis. We found the association H. pylori pathogenicity genes with clinical outcome. The presence of CagT and CagH genes increases risk for development of duodenal ulcer.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Cag pathogenicity island.

Поступила 15.09.2017

ВИРУСОЛОГИЯ

ВИРУСНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ: МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ, ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

*Т.В. Амвросьева, О.Н. Казинец, Н.В. Поклонская, Ю.А. Шилова,
С.К. Лозюк, З.Ф. Богуш*

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

Резюме. Статья посвящена анализу результатов полевых испытаний ранее разработанной нами методической базы для индикации вирусного загрязнения пищевых продуктов (ПП). Методы отбора образцов и их пробоподготовки для различных групп ПП основывались на применении специальных технологий экстракции/сорбции/элюции вирусов-контаминантов, позволяющих сконцентрировать вирусные частицы в малом объеме для последующей их индикации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Проведенные исследования продемонстрировали высокую эффективность применяемых технологий и методов. Средний уровень контаминации анализируемых проб составил 15,24 %. Среди обнаруженных вирусных агентов оказались адено-, норо-, ротавирусы, частота выявления которых составила 5,7 %, 4,76 % и 4,76 %, соответственно.

Ключевые слова: вирусы, пищевые продукты, пробоподготовка, полимеразная цепная реакция, санитарно-вирусологические исследования.

Введение. По результатам проведенного анализа литературных данных к кишечным вирусам (КВ), наиболее часто контаминирующим пищевые продукты (ПП), относятся норо- (НoB), рота- (PВ), кишечные адено- (АdВ), энтеро- (ЭВ), астровирусы (АсВ). Данные вирусные патогены хорошо выживают в окружающей среде — от нескольких недель до нескольких месяцев. Они относятся к различным семействам, но обладают рядом общих свойств: устойчивы к дезинфицирующим средствам, хорошо переносят низкую температуру, замораживание, устойчивы к ультрафиолетовому облучению, антибиотикам, химиопрепаратам [1, 2]. Большинство вирусов высоко контагиозны, имеют низкую инфицирующую дозу от 10 до 100 инфекционных частиц [3, 4].

Как известно, санитарно-вирусологический контроль ПП является одной из важных составляющих государственного санитарного надзора за предприятиями пищевой промышленности, объектами торговли и общественного питания, который осуществляется в целях профилактики пищевых вирусных инфекций. Основной задачей такого контроля является установление источника инфицирования ПП вирусными патогенами и факторов их трансмиссии для недопущения или пресечения реализации пищевого пути передачи инфекционной заболеваемости. Данный контроль можно расценивать как эпидемически значимую профилактическую меру, способствующую успешному управлению качеством и безопасностью среды обитания человека, которая приобретает особо важное значение в условиях осложнения эпидситуации. С этих позиций актуальность разработки и стандартизации эффективных методов индикации вирусной контаминации ПП не вызывает сомнений.

Настоящая работа посвящена анализу полученных результатов в ходе полевых испытаний ранее разработанной нами методической базы для отбора проб

и пробоподготовки образцов различных групп ПП с последующей детекцией в них эпидемически значимых кишечных вирусов.

Материалы и методы исследования. В основе пробоподготовки ПП использована ранее разработанная технология экстракции/сорбции/элюции, позволяющая сконцентрировать вирусные частицы в малом объеме примерно в 200 раз [5]. В работе применен сорбирующий волокнистый материал марки ФИБАН А6 (пр-ва ИФОХ НАН Б). В качестве контроля выделения РНК/ДНК исследуемых вирусов и прохождения ОТ-ПЦР использовали псевдовirusные частицы, созданные на основе армированных нуклеиновых кислот, содержащих фрагмент ЭВ и НоВ (пр-ва РНПЦ ЭМ). Для экстракции вирусов из ПП применяли 0,01 н глициновый буферный раствор (рН=8,8), для элюирования с сорбента — 3 % бифэкстракт (рН=9,6).

Отобрано и исследовано из торговой сети 105 проб ПП, которые включали овощи (помидоры, кабачки, морковь, капусту белокочанную), ягоды замороженные (черника), зелень (укроп, зеленый лук), молочные продукты (йогурт, творог, молоко, сырки творожные), кулинарные продукты (салаты многокомпонентные), колбасные изделия, расфасованные воды. Выделение РНК/ДНК вирусных частиц из проб проводили с помощью набора «Рибопреп», производства «Амплисенс» (г. Москва). Индикация РНК/ДНК осуществлялась методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции. Постановку реакции обратной транскрипции проводили с использованием набора «РЕВЕРТА» производства «Амплисенс» (Россия). Амплификацию полученной в реакции обратной транскрипции кДНК НоВ и ЭВ осуществляли с помощью тест-систем «НоВ II-ПЦР» и «ЭВ-ПЦР», соответственно, производства РНПЦ ЭМ (г. Минск). Выявление ДНК/РНК АдВ группы F, РВ группы А и АсВ проводили с помощью набора «АмплиСенс ОКИ скрин-FL» (г. Москва). Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах RotorGene 3000 и 6000 (CorbettLifeSciences, Австралия) и CFX 96 Real-TimeSystem (Bio-Rad, США). Для накопления фрагментов генома вирусов с целью секвенирования использовали Diamant HF ДНК полимеразу, 2,5х реакционный буфер «HF», содержащий 0,5 мМ смесь дезоксинуклеотидов и 5 мМ раствор MgCl₂ (ГНУ «Институт микробиологии НАН Б», Беларусь). Амплификацию нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров и зондов, синтезированных фирмой PrimeTech (Беларусь).

Реакцию секвенирования проводили с помощью набора «Genom Lab Dye Terminator Cycle Sequencingwith Quick Start Kit» (Beckmancoulter, США). Детекцию результатов проводили на приборе CEQ 8 000 (Beckmancoulter, США), анализ результатов — в MEGA6 [6].

Молекулярное типирование выполняли с использованием программного продукта Norovirus Genotyping Tool Version 1.0, доступного для свободного использования в режиме онлайн по адресу <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>, и BLAST, открытого для свободного использования по адресу <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Результаты исследования и обсуждение. Для стандартизации проводимых исследований ПП разделили на три группы в соответствии с их консистенцией — твердые, полутвердые и жидкие (таблица 1).

В качестве контроля при проведении стадий пробоподготовки использовали раствор псевдовirusных частиц, состоящих из диагностически значимых фрагментов РНК ЭВ или НоВ, упакованных в белковую оболочку бактериофага MS2. Основным свойством этих контролей является способность имитировать РНК-содержащий безоболочечный вирус и тем самым контролировать все этапы санитарно-вирусологического исследования ПП, начиная с этапа сорбции-элюции, и заканчивая диагностической ПЦР.

Пробы ПП, прошедшие первичную обработку, далее исследования методом ПЦР на наличие генетического материала эпидемически значимых возбудителей острых кишечных вирусных инфекций: ЭВ, РВ, НоВ, АдВ, АсВ.

Таблица 1. — Группирование исследуемых ПП в зависимости от их консистенции

Консистенция	Наименование
Твердые	Овощи
	Зелень
	Колбасные изделия
	Кулинарные изделия (салаты)
Полутвердые	Молочные продукты (йогурт, творог, творожные сырки, сметана,)
Жидкие	Молочные продукты (молоко, кефир)
	Расфасованные напитки

В результате проведенных исследований установлено, что средний уровень контаминации анализируемых проб составил 15,24 %. Наиболее контаминированными были пробы овощей и салатов (таблица 2, рисунок 1). Отрицательными оказались пробы фруктов, расфасованных вод и морепродуктов.

Таблица 2. — Перечень и результаты исследования ПП на наличие генетического материала кишечных вирусов.

№ п/п	Наименование	Количество исследованных проб	Количество положительных проб
1	Овощи	20	7
2	Зелень	3	1
3	Фрукты	6	0
4	Молочные продукты	19	2
5	Салаты	37	5
6	Морепродукты	5	0
7	Расфасованные воды	4	0
8	Колбасные изделия	11	1
	Всего:	105	16

Среди обнаруженных вирусных агентов были АдВ, НоВ и РВ, частота их детекции составила 5,7 %, 4,76 % и 4,76 %, соответственно. В разных салатах и овощной продукции отмечались положительные находки в отношении полного спектра выявленных вирусов. В молочных продуктах были зарегистрированы НоВ, в колбасных изделиях — АдВ, а в зелени — РВ. ЭВ и АсВ в исследованных пробах не обнаружены.

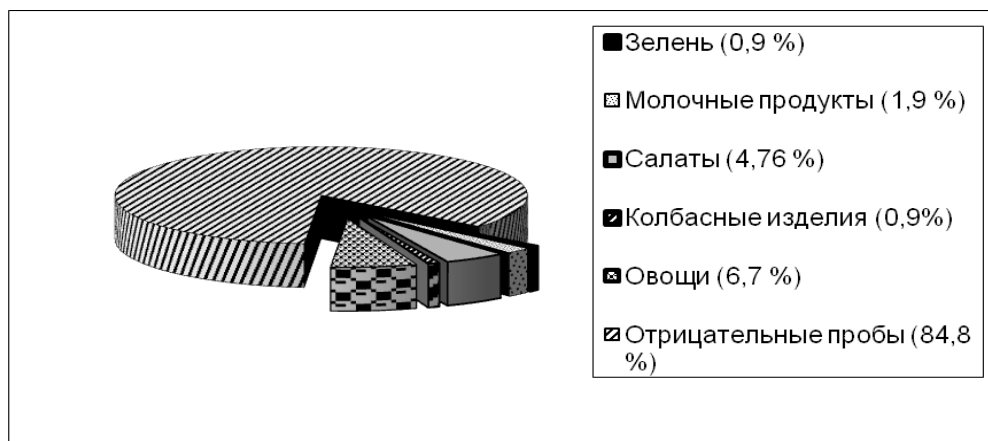


Рисунок 1. — Частота выявления вирусного материала в различных группах ПП методом ПЦР, в %

Как известно, молекулярно-эпидемиологические исследования являются важным и заключительным этапом санитарно-вирусологического контроля ПП. Они направлены на установление путей и факторов передачи инфекционной заболеваемости, что достигается путем сравнения генетических характеристик обнаруженных вирусов-контаминантов ПП с таковыми вирусов-возбудителей инфекций, обнаруженных у пациентов. Одной из естественных трудностей проведения такого сравнительного анализа может быть малая концентрация содержащегося в контаминированных ПП вирусного материала (в наших экспериментах она была в пределах 1–10 геномных эквивалентов на мл). В связи с этим не всегда представляется возможным накопить фрагменты вирусной ДНК в количестве, достаточном для проведения секвенирования. В наших исследованиях это удалось сделать для двух положительных проб ПП, содержащих НоВ: выделена вирусная РНК и накоплены фрагменты гена РНК-зависимой РНК-полимеразы и VP1 региона с последующим секвенированием и молекулярным типированием.

Таблица 3. — Результаты генотипирования положительных проб ПП, контаминированных НоВ

Регистрационный № образца	Источник получения	Тип вируса	Результат генотипирования	Номер депонента в GenBank
14979/1	Овощи (кабачок)	Норовирус	GI.4 2006b DenHaag	KY214375
14979/2	Овощи (кабачок)	Норовирус	GI.4 2006b DenHaag	KY214376

Анализ полученных результатов показал, что обнаруженные в кабачках НоВ, принадлежали к генотипу GI.4 206b DenHaag. Как оказалось, данный генотип ранее циркулировал среди населения нашей страны и был этиологическим агентом регистрируемой заболеваемости острыми гастроэнтеритами (таблица 3).

Проведенные исследования продемонстрировали высокую эффективность применяемых технологий и методов выявления и идентификации вирусной контаминации ПП, что дает основания для их широкого внедрения в практику санитарно-вирусологических исследований в рамках осуществляемого госсаннадзора, а также использования в научно-исследовательских целях.

Литература

1. Koopmans, M. Foodborne viruses: an emerging problem / M. Koopmans, E. Duizer // Int. J. Food Microbiol. — 2004. — Vol. 90. — P. 23–41.
2. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000 / B. A. Lopman [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 9, No. 1. — P. 1995–2000.
3. Appleton, H. Control of food-borne viruses. Health and the food-chain / H. Appleton // Brit. Med. Bull. — 2000. — Vol. 56. — P. 172–183.
4. 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. V. Kroneman [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46, No. 9. — P. 2959–2965.
5. Амвросьева, Т. В. Новые методические решения выявления вирусной контаминации объектов среды обитания человека / Т. В. Амвросьева, О. Н. Казинец // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. Г. Е. Косяченко. — Минск, 2013. — Вып. 22. — С. 3–6.
6. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6,0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2013. — Vol. 30, No. 12. — P. 2725–2729.

VIRAL CONTAMINATION OF FOODSTUFFS: METHODS OF DETECTION AND IDENTIFICATION, EXPERIENCE OF USE IN SANITARY AND VIROLOGICAL RESEARCH

*T.V. Amvrosieva, O.N. Kazinets, N.V. Paklonskaya,
Yu.A. Shilova, C.K. Laziuk, Z.F. Bohush*

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

The article is devoted to the analysis of the results of tests of the previously developed methodological base for the indication of viral contamination of food products (FP). Methods for sampling and sample preparation for various groups of FP were based on the use of special technologies for extraction / sorption / elution of viruses-contaminants which allow to concentrate viral particles in a small volume for their subsequent indication by polymerase chain reaction (PCR). The carried out researches have shown high efficiency of applied technologies and methods. The average level of contamination of the analyzed samples was 15.24 %. Among the detected viral agents were adeno-, noro-, rotaviruses, the detection rate of which was 5.7 %, 4.76 % and 4.76 %, respectively.

Keywords: viruses, food products, sample preparation, polymerase chain reaction, sanitary and virological studies.

Поступила 23.08.2017

МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИНДИКАЦИИ ВИРУСОВ-КОНТАМИНАНТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

*Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, О.Н. Казинец, С.К. Лозюк, Ю.А. Шилова,
З.Ф. Богуш, А.С. Аринович*

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

Резюме. Статья посвящена разработке мультиплексной технологии для улавливания, концентрирования и ПЦР-детекции кишечных вирусных патогенов (норо-, рота-, энтеровирусов), контаминирующих поверхности объектов среды обитания человека (ОСОЧ). Полученные результаты являются основой дальнейших биотехнологических работ по созданию мультиплексного набора для индикации вирусов-контаминантов ОСОЧ при осуществлении санитарно-вирусологических исследований.

Ключевые слова: контаминация вирусами объектов среды обитания человека, метод сорбции-элюции, волокнистый ионообменный материал, полимеразная цепная реакция.

Введение. Как известно, контактно-бытовой путь является одним из ведущих в реализации фекально-орального механизма передачи кишечных вирусных инфекций. К числу эпидемически значимых для нашей страны возбудителей этой многочисленной группы инфекционной заболеваемости относятся норо-, рота и энтеровирусы [1–3]. Вызываемые ими инфекции являются вакцинонеуправляемыми, что делает их массовыми (часто вспышечными) и приводит к серьезным социальным и экономическим последствиям. В этих условиях особую актуальность приобретает санитарно-вирусологический контроль предметов и объектов среды обитания человека (ОСОЧ), основной задачей которого является своевременное выявление их вирусного загрязнения с целью предотвращения или пресечения контактно-бытового пути передачи вирусных инфекций. Данный контроль невозможен без наличия соответствующих средств индикации вирусов-контаминантов, позволяющих их оперативно уловить и идентифицировать [3, 4]. Для успешного решения данной проблемы весьма интересным и перспективным подходом при создании таких средств является объединение технологии улавливания и концентрирования вирусов с технологией непосредственной детекции вирусного материала (по принципу «два в одном»). Этот подход, несомненно, повышает технологичность санитарно-вирусологических исследований, а также обеспечивает их стандартизацию и оперативность.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы была разработка мультиплексной технологии для улавливания, концентрирования и ПЦР-детекции кишечных вирусных патогенов (норо-, рота-, энтеровирусов), контаминирующих поверхности ОСОЧ.

Материалы и методы исследования. Моделирование искусственной вирусной контаминации ОСОЧ осуществляли на металлической, стеклянной и пластиковой поверхностях с использованием псевдовирусных частиц (ПВЧ), созданных на основе армированных нуклеиновых кислот, содержащих фрагмент энтеро- и норовирусов, титр которых составлял 10^5 ГЭ/мл (пр-ва РНПЦ ЭМ, Беларусь).

В основу получения смывов с ОСОЧ и их пробоподготовки была положена технология сорбции/элюции, позволяющая сконцентрировать вирусные частицы (примерно в 200 раз) в малом объеме [5]. На этапе получения смывов с поверхностей в качестве тампонов применяли сорбирующий волокнистый материал марки ФИБАН А6

(пр-ва ИФОХ НАН Б), который увлажняли в фосфатно-солевом буферном растворе (рН=7,4). Для элюирования вирусов с тампона использовали 3 % бифэкстракт (рН= 9,6).

Детекцию РНК энтеровирусов (ЭВ), норовирусов (НоВ), ротавирусов (РВ) проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «РЕВЕРТА» (пр-ва, «АмплиСенс», Россия), постановку ПЦР — тест-систем «ЭВ-ПЦР», «НоВП-ПЦР» (производства РНПЦ ЭМ), «ОКИ-скрин» (производства «АмплиСенс», Россия), а также смеси дезоксинуклеотидов, олигонуклеотидов, Taq-полимеразы, 10х реакционного буфера и раствора MgCl₂ (производства PrimeTech, Беларусь).

Результаты исследований и обсуждение. Первый этап работ был посвящен отработке технологии получения и пробоподготовки смывов с поверхностей ОСОЧ с использованием в качестве сорбента вирусов-контаминантов волокнистого ионообменного материала марки ФИБАН А6 отечественного производства, который ранее показал свою эффективность при санитарно-вирусологических исследованиях воды и пищевых продуктов [6, 7]. Подбор условий для наиболее эффективного прохождения стадий сорбции/элюции осуществляли на искусственно контаминированных поверхностях, на которые наносили раствор ПВЧ в объеме 1,0 мл. В результате выполненных исследований были подобраны оптимальные параметры, позволяющие сконцентрировать ПВЧ с высокой эффективностью. Установлено, что использование сорбента массой 2 г, увлажненного 0,01 н раствором ФСБ (рН=7,4), и проведение элюции 3 % бифэкстрактом (рН=9,6) в объеме 5 мл в течение 30 мин, позволяют провести этап получения смывов и их концентрирования со 100 % эффективностью.

Следующий этап исследований был направлен на разработку технологии постановки мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Для этих целей были подобраны соответствующие комплекты праймеров и зондов для детекции ЭВ, НоВ, РВ и внутреннего контрольного образца (ВКО) [7–9].

При выборе праймеров и зондов для детекции НоВ построены полногеномные выравнивания 80 геномов НоВ II геногруппы, включавших большинство известных на сегодняшний день генотипов НоВ — GI.1–GI.17. Идентифицирован консервативный регион генома, расположенный между 4984 и 5107 позициями генома НоВ (максимальная доля нуклеотидных различий — 15 %). В пределах этого участка с использованием различных компьютерных программ и ручного поиска выбрано 3 прямых, 2 обратных праймера и 1 гибридизационный зонд, которые имели минимальную степень нуклеотидной вариабельности и обладали наилучшими рассчитанными характеристиками, в том числе: температура отжига — не ниже 60°C, доля GC — не менее 45 и не более 55 %, отсутствие димеров и шпилек, рейтинг среди всех найденных праймеров не менее 60. Осуществлен синтез выбранных праймеров и зондов, проведена экспериментальная сравнительная оценка их эффективности. Полученные результаты показали, что минимальные пороговые циклы, указывающие на максимальную эффективность амплификации были получены с праймерами No-coG2F (прямой), CoG2R (обратный) и гибридизационным зондом NoG2-Z (таблица 1).

Таблица 1. — Комплекты праймеров и гибридационных зондов для детекции НоВ II геногруппы и ЭВ

Название	Последовательность 3'→5'	Модификация 3'	Модификация 5'	Тип праймера
Комплект праймеров для детекции норовирусов II геногруппы				
No-coG2F	GARYCIATGTTYAGRTGGATGAG	-	-	Прямой
NoG2-Z	AGCACGTGGGAGGGCGATCG	ROX	BHQ2	Обратный
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	-	-	Гибридационный зонд
Комплект праймеров для детекции энтеровирусов				
EV-F3	CTGAATGCGGCTAATCCYAAC	-	-	Прямой
PanEV-Z	CCGACTACTTTGGGWGTCCGTGT	ROX	BHQ2	Обратный
PanEV-R	GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA	-	-	Гибридационный зонд

Подбор праймеров и зондов для детекции ЭВ включал построение полногеномного выравнивания 4-х консенсусных последовательностей ЭВ, которые принадлежали к 4 основным видам в пределах этого рода (Human Enterovirus A, B, C, D). Установлено, что наиболее консервативный участок расположен в пределах с 467 по 584 позицию в геноме. С использованием программного и ручного поиска выбрано 3 прямых праймера, 5 зондов и 2 обратных праймера для ЭВ. Они имели следующие характеристики: температура отжига — не ниже 57°C, доля GC — не менее 40 и не более 65 %, отсутствие димеров и шпилек, рейтинг среди всех найденных праймеров не менее 65. После синтеза этих праймеров и зондов было проведено сравнение эффективности амплификации с каждым из использованных комплектов в эксперименте. По результатам выполненных исследований наиболее низкие пороговые циклы реакции, свидетельствующие о ее максимальной эффективности, были получены с комплектом EV-F3 (прямой), PanEV-R (обратный) и PanEV-Z (гибридационный зонд) (таблица 1).

Разработка праймеров и зондов для выявления ВКО в мультиплексной ПЦР включала построение выравнивания, включающее фрагмент нуклеотидной последовательности, содержащий последовательности генов матуразы и белка оболочки 13 различных штаммов и изолятов фага MS2. С использованием этого выравнивания был осуществлен подбор праймеров и зондов, локализованных в наиболее консервативных регионах. Поиск праймеров осуществлялся внутри данного фрагмента с использованием автоматического (программой Primer Premier) и ручного поиска. В результате оценки основных параметров (вырожденность, Tm, GC %, ΔG, GC клэмп, образование димеров, шпилек и наличие сайтов неспецифического связывания) с целью последующей экспериментальной оценки их свойств были выбраны 2 прямых праймера, 2 обратных праймера и 2 зонда (таблица 2). После синтеза указанных праймеров были проведены их экспериментальные испытания для выявления ВКО, результаты которых представлены в таблице 3.

Таблица 2. — Праймеры и зонды для детекции ВКО

Праймер	Последовательность, 5'-3'	Метка, 5'	Метка, 3'
MS2F1	GGAAGTGGCGACGTGACTGT	-	-
MS2R1	GCTCTGACGAACGCTACAGGTT	-	-
MS2Z1f	CAACTTCGC TAA CGG GGT CGC TGA ATG	FAM	BHQ-1
MS2F2	GCATTAATCAGGCAACGGCTCT	-	-
MS2R2	TCGCCAGTTCGCCATTGTC	-	-
MS2Z2f	AGAGCCCTCAACCGGAGTTTGAAGCA	FAM	BHQ-1

Из таблицы 3 видно, что эффективность амплификации кДНК ВКО с MS2F2/MS2R2/MS2Z2f была выше, чем с MS2F1/MS2R1/MS2Z1f. Исходя из этих данных, праймеры и зонд MS2F2/MS2R2/MS2Z2f были выбраны для использования на следующих этапах работы.

Таблица 3. — Средние значения пороговых циклов амплификации кДНК ВКО

Сочетание праймеров/зондов	Среднее значение порогового цикла (Ct)
MS2F1/ MS2R1/ MS2Z1f	24,6
MS2F2/ MS2R2/ MS2Z2f	23,36

По имеющимся литературным данным известно, что наиболее консервативным регионом генома РВ группы А является ген неструктурного белка NSP3, локализованный в 7 сегменте генома. Для достижения максимальной эффективности детекции РВ праймеры и зонд должны быть локализованы в наиболее консервативных участках. Поэтому было построено множественное выравнивание 7 сегмента различных генотипов РВ группы А и осуществлен поиск праймеров в пределах наиболее консервативных участков этого сегмента. После выравнивания и последующего анализа характеристик праймеров и зондов был выбран комплект олигонуклеотидов, локализованных в 3'-конце гена NSP3 (таблица 4).

Таблица 4. — Схема праймеров и зонда, локализованные в гене NSP3 для амплификации и специфической детекции РВ А

№	Название	Последовательность, 5'→3'	Модификация 5'	Модификация 3'	Характеристика
1	RvF1	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	-	-	Прямой
2	RvR1	GGTCACATAACGCCCTATAGC	-	-	Обратный
3	RvPr1	AGTAAAAGCTAACACTGTCAAA	FAM	BHQ-1	Зонд

На основании далее проведенного анализа литературы на предмет определения других значимых для диагностической ОТ-ПЦР регионов-мишеней генома РВ группы А, был выбран еще один комплект олигонуклеотидов, локализованных в гене VP6. Таким образом, для специфической ПЦР детекции РВ группы А были составлены 2 схемы праймеров и зондов, локализованных в генах NSP3 и VP6 (таблица 5).

Таблица 5. — Схема праймеров и зонда, локализованных в гене VP6 для амплификации и специфической детекции РВ группы А

№	Название	Последовательность, 5'→3'	Модификация 5'	Модификация 3'	Характеристика
1	RvF2-1	GGATGTCCTGTA CTCTTGTC AAAA	-	-	Прямой
2	RvF2-2	GGAGGTTCTGTA CTATTGTCA AAAA	-	-	Прямой
3	RvR2	TCCAGTTTGRAASTCATTTCCA	-	-	Обратный
4	RvPr2-1	ATAATGTGCCTTCGACAAT	FAM	BHQ-1	Зонд

Подобранные комплекты праймеров и зондов для ПЦР детекции ЭВ, НоВ и РВ группы А были успешно апробированы в ходе проведения их полевых испытаний в соответствии с вышеописанными технологиями отбора и концентрирования проб с поверхностей ОСОЧ.

Полученные результаты будут использованы в дальнейших биотехнологических разработках по созданию мультиплексного набора для индикации вирусов-контаминантов ОСОЧ при осуществлении санитарно-вирусологических исследований.

Литература

1. An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall / M. R. Evans [et al.] // *Epidemiol. Infect.* — 2002. — Vol. 129. — P. 355–360.
2. Boone, S. A. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease / S. A. Boone, C. P. Gerba // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — Vol. 73. — P. 1687–1696.
3. Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces / K. Cherer [et al.] // *Food Environ. Virol.* — 2009. — Vol. 1. — P. 42–49.
4. Norovirus infection in Belarus: occurrence and molecular epidemiology / N. V. Paklonskaya [et al.] // *Cent. Eur. J. Public Health.* — 2015. — Vol. 23. — P. 69–72.
5. Амвросьева, Т. В. Новые методические решения выявления вирусной контаминации объектов среды обитания человека / Т. В. Амвросьева, О. Н. Казинец // *Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены; гл. ред. Г. Е. Косяченко.* — Минск, 2013. — Вып. 22. — С. 3–6.
6. Проблема вирусологической безопасности пищевых продуктов и методы индикации их вирусного загрязнения / О. Н. Казинец [и др.] // *Донозоология и здоровый образ жизни.* — 2012. — № 2. — С. 30–33.
7. International collaborative study to compare reverse transcriptase pcr assays for detection and genotyping of noroviruses / J. Vinje [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41, No. 4. — P. 1423–1433.
8. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses / S. Kojima [et al.] // *J. Virol. Methods.* — 2002. — Vol. 100. — P. 107–114.
9. Sensitive and specific quantitative detection of rotavirus A by one-step real time reverse transcription-PCR assay without antecedent double-stranded-RNA denaturation / S. Mijatovic-Rustempasic [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2013. — Vol. 51, No. 11. — P. 3047–3054.

METHODS AND TECHNOLOGIES OF INDICATION OF VIRUSES-CONTAMINANTS OF HUMAN HABITAT OBJECTS

*T.V. Amvrosieva, N.V. Paklonskaya, O.N. Kazinets, S.K. Laziuk, Yu.A. Shilova,
Z.F. Bohush, A.S. Arinovich*

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

The article is devoted to the development of a multiplex technology for trapping, concentrating and PCR detection of intestinal viral pathogens (noro-, rota-, enteroviruses) that contaminate the surfaces of human habitat objects (ННО). The obtained results are the basis for further biotechnological work on the creation of a multiplex kit for the indication of viruses-contaminants of the ННО in the implementation of sanitary-virological studies.

Keywords: viral contamination of human habitat objects, sorption-elution method, fibrous ion-exchange material, polymerase chain reaction.

Поступила 12.09.2017

ВКВ И JCV ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

*Т.В. Амвросьева¹, З.Ф. Богуш¹, Е.П. Кишкурно¹, Н.В. Поклонская¹,
А.С. Аринович¹, С.В. Байко²*

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

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Резюме. По современным представлениям полиомавирусная инфекция (ПВИ) является одной из известных причин развития посттрансплантационных осложнений при пересадке почки в условиях применения иммуносупрессивной терапии. В статье представлены данные о частоте и динамике регистрации данной инфекции у детей-реципиентов почки в раннем и позднем послеоперационном периодах. Среди детектируемых возбудителей преобладал JC полиомавирус. Полученные результаты указывают на актуальность изучаемой проблемы и диктуют необходимость совершенствования тактики ведения реципиентов в посттрансплантационном периоде.

Ключевые слова: ВК вирус, JC вирус, трансплантация почки у детей, иммуносупрессия, генодиагностика, полиомавирусная инфекция.

Введение. В перечне известных вирусных осложнений послеоперационного периода у реципиентов почки наибольшую потенциальную опасность для нормального функционирования трансплантата представляет полиомавирусная инфекция (ПВИ). Ее возбудителями являются полиомавирусы (семейство *Polyomaviridae*) — небольшие ДНК-содержащие вирусы, инфицирующие человека, а также птиц, некоторых млекопитающих, рыб. В настоящее время выделено 4 рода данного семейства, включающие 80 видов, среди которых полиомавирусы человека отнесены к 13 видам. Наиболее известными из них являются ВК вирус (*Human polyomavirus 1*, ВКВ) и JC вирус (*Human polyomavirus 2*, JCV). Заражение человека, как правило, происходит в раннем детстве — до 10 лет. Клинически инфекция обычно проявляется в виде респираторной патологии за счет тропности вирусов к клеткам эпителия респираторного тракта и тонзиллярной ткани. Иммунная система не элиминирует данные вирусы из организма полностью и инфекция переходит в латентную форму,

сопровождаящуюся персистенцией возбудителей с вовлечением клеток почек и мочевыводящего тракта. Для JCV, кроме того, характерна персистенция в клетках мозга, селезенки и В-лимфоцитах. В связи с этим среди взрослого населения доля серопозитивных лиц достигает 80 % и более. Переход полиомавирусной инфекции (ПВИ) из латентной формы в активную (реактивация инфекции) сопровождается лабораторно определяемыми периодами вирурии (с наличием вируса в моче) без каких-либо характерных клинических симптомов [1, 2]. Реактивация ПВИ имеет прямую зависимость от состояния иммунной системы человека. Наиболее часто она происходит у иммунодефицитных пациентов, к которым относятся реципиенты органов и клеток. Эта группа пациентов является одной из самых уязвимых в плане возможности реактивации ПВИ, которая может привести к тяжелым послеоперационным осложнениям. По литературным данным реактивация ПВИ происходит вследствие подавления основных эффекторов клеточного иммунитета — CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов — и, соответственно, уменьшения их количества. Так, сегодня известно, что следствием развития JCV-инфекции у иммунодефицитных лиц может быть прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия (ПМЛ). Есть сообщения о выявлении JCV в опухолях толстого кишечника, а также при множественном склерозе. Почки и мочевыводящий тракт являются местом персистенции и реактивации для обоих вирусов. Пациенты, перенесшие трансплантацию почки, подвержены более высокому риску инфицирования мочевых путей не только в результате оперативных вмешательств, но и вследствие предшествующей хронической болезни почек. Антибактериальные свойства мочи (высокая осмолярность, низкий pH, высокий уровень мочевины) утрачиваются, приводя к прогрессирующему повреждению уроэпителия [3].

При отсутствии контроля за реактивацией возбудителя и развитием ПВИ, последняя может стать причиной полиомавирус-ассоциированной нефропатии (ПВАН), геморрагического цистита, асимптоматической гематурии, уретрального стеноза. ПВАН является основной патологией, вызываемой ВКВ. Она развивается у 1—10 % реципиентов почки и почти в 50 % случаев приводит к почечной дисфункции, а в тяжелых случаях — к потере трансплантата [4]. Так, по данным зарубежных исследований, посвященных мониторингу полиомавирусной инфекции детей реципиентов почки, ВК вирус-ассоциированная нефропатия развилась у 4,3 % наблюдаемых пациентов [5].

Настоящая статья посвящена анализу результатов исследований по генодиагностике ВКВ и JCV инфекций в раннем и позднем посттрансплантационном периодах у детей-реципиентов почки на фоне применяемой иммуносупрессивной терапии.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся клинический материал — сыворотка крови и моча детей-реципиентов почки, находящихся на лечении в УЗ «2-я городская детская клиническая больница». Всего проанализировано 349 проб клинического материала (98 образцов сыворотки крови, 251 образец мочи) от 81 реципиента. Для динамических наблюдений образцы клинического материала отбирались по следующей схеме: до 3 месяцев — с интервалом в 2 недели (на 1–4-е, 14-е сутки, через 1; 1,5; 2; 2,5 и 3 месяца), с 3 месяцев до 1 года — с интервалом 3 месяца (6, 9, 12 месяцев).

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили 1:1 транспортной средой (производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Образцы цельной крови инкубировали 1 час при температуре 37°C, затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут, после чего отбирали сыворотку.

Выделение ДНК из мочи осуществляли с помощью «Комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-АМ» (АмплиПрайм, Россия); из сыворотки крови — «Набора реагентов "S-сорб" для выделения ДНК на сорбенте» (Синтол, Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Детекцию ДНК ВКВ/JCV проводили в соответствии с «Методикой для определения ДНК полиомавирусов» [6]. Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторах RotorGene 3000 и 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия).

Результаты исследования и обсуждение. При проведении генодиагностических исследований в отношении ПВИ дети-реципиенты почки были разделены на 2 группы. К группе 1 отнесены реципиенты, которые мониторировались в раннем посттрансплантационном периоде (в течение 3 месяцев после операции); к группе 2 — реципиенты, у которых первый отбор клинического материала для выявления ПВИ был осуществлен в позднем посттрансплантационном периоде (позднее трех месяцев после операции).

Медиана возраста реципиентов группы 1 составила 15 лет, группы 2 — 10,02 года, в обеих группах в целом — 14,75 лет.

По результатам проведенных исследований ни в одной из опытных групп вирусемия (наличие вируса в крови) не была выявлена. При этом генетические маркеры ПВИ регистрировались у 44,4 % обследуемых детей (n=81). JCV инфекция в целом (30,86 %) встречалась достоверно чаще, чем ВКВ инфекция (13,42 %) (p<0,01). Установлено также, что в раннем посттрансплантационном периоде ПВИ выявлялась достоверно чаще, чем в позднем (p<0,05). Причем в группе 1 зарегистрировано больше пациентов с ВКВ инфекцией (38,89 % — 7/18), а в группе 2 — с JCV инфекцией (31,75 % — 20/63) (таблица).

Таблица — Результаты генодиагностики ПВИ у детей-реципиентов почки

Группа реципиентов, период после трансплантации	Частота выявления ВКВ инфекции, %	Частота выявления JCV инфекции, %	Общая частота выявления ПВИ, %
Группа 1 (n=18)	38,8	27,78	66,67
Группа 2 (n=63)	6,35	31,75	38,1

При анализе динамики первичной реактивации ПВИ в посттрансплантационном периоде среди реципиентов группы 1 (рисунок 1) установлено, что она может произойти уже в течение первых четырех суток, причем у большинства положительных пациентов — в период первого месяца после операции. Общая доля реактивации ПВИ в этот период составила 50 % (у 6 реципиентов из 12).

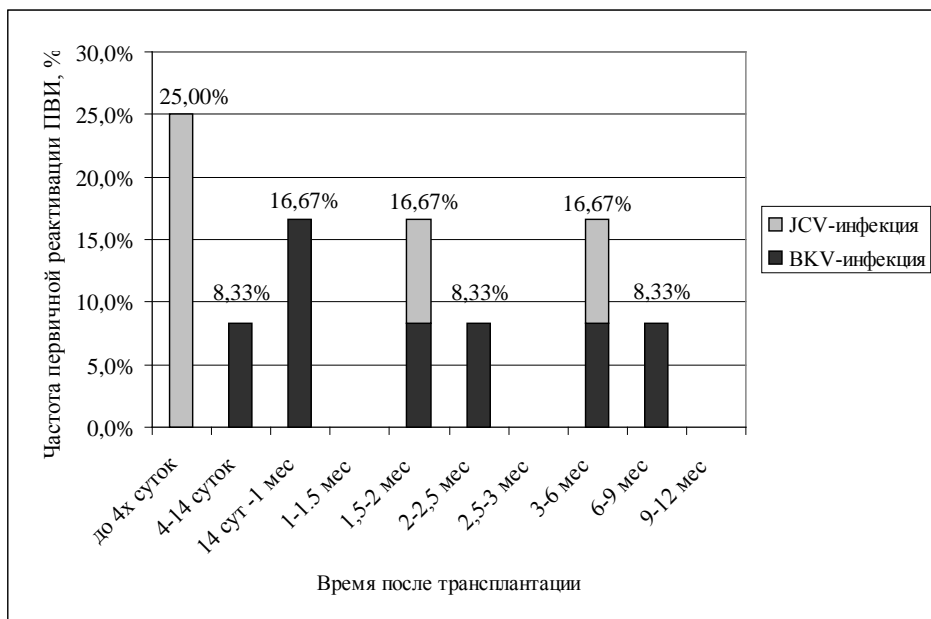


Рисунок 1. — Динамика первичной реактивации ПВИ в опытной группе 1 (n=12)

Далее была проанализирована частота регистрации ПВИ (BKV и JCV инфекций) в группе 1 (n=15) в разные сроки раннего посттрансплантационного периода (рисунок 2). Установлено, что максимальное число пациентов с ПВИ было выявлено ко 2,5 месяцу наблюдения (40 %).



Рисунок 2. — Частота регистрации ПВИ у детей-реципиентов почки в течение 3 месяцев после трансплантации (n=15)

В обеих опытных группах имелись как реципиенты с транзитной ПВИ (регистрацией однократной вирурии), так и реципиенты, у которых возбудитель в моче обнаруживался в течение 3 и более месяцев (у 18 из 81).

Полученные в настоящем исследовании данные указывают на достаточно высокую частоту регистрации ПВИ у детей-реципиентов почки (44,4 %) на фоне применяемой иммуносупрессии более 2,5 месяцев, что указывает на наличие реального риска развития у них связанных с данной инфекцией посттрансплантационных осложнений и требует коррекции схем иммуносупрессивной терапии.

Литература

1. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: an update / U. Moens [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* — 2017. — Vol. 54. — P. 18–38.
2. 45 years after the discovery of human polyomaviruses BK and JC: time to speed up the understanding of associated diseases and treatment approaches / H. Barth [et al.] // *Crit. Rev. Microbiol.* — 2017. — Vol. 43. — P. 178–195.
3. Tolkoff-Rubin, N. E. Urinary tract infection in the renal transplant recipient / N. E. Tolkoff-Rubin, R. H. Rubin // *Urin. Tract Infect.* — 1997. — Vol. 1. — P. 27–33.
4. Kuypers, D. R. J. Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients / D. R. J. Kuypers // *Nature Rev. Nephrol.* — 2012. Vol. 8. — P. 390–402.
5. Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: evaluation using a quantitative real-time PCR technique / J. Herman [et al.] // *Pediatr. Transplant.* — 2004. — Vol. 8. — P. 485–492.
6. Экспериментальная отработка технологии дифференциальной диагностики полиомавирусной инфекции / Т. В. Амвросьева [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр.* — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — С. 123–128.

BKV AND JCV INFECTION IN CHILDREN AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

*T. V. Amvrosieva¹, Z. F. Bohush¹, E. P. Kishkurno¹, N. V. Poklonskaya¹,
A. S. Arinovich¹, S. V. Baiko²*

¹*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;*

²*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

Currently, polyomavirus infection (PVI) is one of the known causes of posttransplant complications after kidney transplantation under conditions of immunosuppressive therapy. The article presents data on the frequency and dynamics of registration of this infection in pediatric kidney recipients in the early and late postoperative periods. Among the detectable pathogens, JC polyomavirus prevailed. The obtained results indicate the relevance of the problem under study and show the need to improve the tactics of conducting recipients in the posttransplant period.

Keywords: BK virus, JC virus, kidney transplantation in children, immunosuppression, genodiagnosis, polyomavirus infection.

Поступила 05.09.2017

СЕКОТРИТЕРПЕНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНГИБИТОРЫ ВИРУСА ГЕРПЕСА

Е. И. Бореко, О. В. Савинова

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

Резюме. Объектом исследования являлись вещества, полученные в результате синтетических трансформаций растительного пентациклического тритерпенового спирта бетулина (замещенные секотритерпеноиды) из Института технической химии (филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский

федеральный исследовательский центр» Уральского Отделения РАН. Выполнено исследование противовирусных свойств 27 соединений. Использовали вирус герпеса простого 1 типа (штамм 1 С) и линию клеток рабдомиосаркомы человека. Вирусингибирующие свойства (способность подавлять репродукцию вируса) исследовали путем добавления к культуре клеток непосредственно после инфицирования поддерживающей среды с предварительно растворенными в ней веществами. Вирулицидные свойства определяли как остаточную инфекционность вируса после контакта вирусодержащей жидкости с растворами (суспензиями) веществ. Среди исследованных веществ 12 обладали вирусингибирующими свойствами, 6 веществ — вирулицидными свойствами. Среди тритерпеноидов, обладающих обоими видами активности одновременно, выявлены два соединения-лидера, первое — лидер по вирусингибирующей активности, второе — лидер по вирулицидной активности. Вирусингибирующими и вирулицидными свойствами обладал также бетулин. В предварительных исследованиях на лабораторных животных установлено, что при экспериментальном кожном герпесе белых мышей применение 2 % мази первого из тритерпеновых соединений-лидеров приводит к уменьшению выраженности признаков поражения в сравнении с применением мазевой основы. Эффективностью при данной инфекции обладала также мазь бетулина. Исследование выполняется при финансовой поддержке Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных Исследований, договор от 20.05.2016 № М16Р-012.

Ключевые слова: секотритерпеноиды, вирус герпеса простого, вирусингибирующие свойства, вирулицидные свойства, экспериментальный кожный герпес

Введение. Наиболее эффективными и чаще всего применяемыми противогерпетическими средствами являются ацикловир (ациклогуанозин) и его аналоги. В связи с опосредованностью антивирусного действия ацикловира и родственных соединений вирусспецифической тимидинкиназой наиболее частые случаи их неэффективности обусловлены природным или приобретенным дефицитом фермента в структуре возбудителя. Дополнительно к этому, лекарственная устойчивость вирусов герпеса к ацикловиру может быть обусловлена мутацией в гене ДНК-полимеразы вируса. Возможна комбинированная причина устойчивости, обусловленная одновременным изменением в двух генах возбудителя [1].

Учитывая, что значительная роль в лечении заболеваний, вызванных вирусами герпеса простого и герпеса опоясывающего, принадлежит лекарственным средствам наружного (местного) применения, важным свойством последних может быть способность нейтрализовать инфекционность возбудителя во внеклеточной среде, сочетающаяся с одновременным ингибированием репродукции возбудителя в клетках. Такое воздействие приведет к увеличению эффективности и даст новые возможности в выборе средств эффективной терапии герпесвирусной инфекции и профилактики ее рецидивов.

Известно, что суммарными вирулицидными свойствами обладают экстракты лекарственных растений, вирусингибирующие свойства встречаются реже [2, 3]. Наиболее ценным является сочетание обоих видов противовирусной активности — способности ингибировать репродукцию возбудителя в чувствительных клетках и способности нейтрализовать его инфекционность во внеклеточной среде. Считается, что сочетание вирусингибирующей и вирулицидной активности обусловлено многокомпонентностью химического состава растений [4], и в большей степени это присуще сборам лекарственных трав.

В отношении индивидуальных веществ растительного происхождения, в частности, тритерпеновых соединений, такого мнения не существует. Механизм противовирусного действия тритерпеноидов в настоящее время связывают с вмешательством в начальные и/или заключительные стадии репродукции вируса [5, 6], их вирулицидные свойства при попытках установления механизма действия известных тритерпеновых ингибиторов репродукции вирусов на примере ВИЧ не установлены [7] или минорны в отношении вируса герпеса простого [8].

Вместе с тем, в собственных предварительных исследованиях нами было показано, что индивидуальные вещества растительного происхождения также могут обладать вирусингибирующими и вирулицидными свойствами одновременно. В частности, это некоторые тритерпеновые соединения. Изначально они были известны как класс веществ, присутствующих в растениях и некоторых видах морских обитателей. Наиболее известным из них является бетулин, основным источником которого служит кора берез. К настоящему времени произведены многочисленные синтетические трансформации бетулина и других природных тритерпеноидов и установлены мультимедикаментозные, включая противовирусные, свойства этих веществ.

В связи с этим при выполнении настоящей работы проведено исследование вирусингибирующих и вирулицидных свойств новых синтетических производных тритерпеновых соединений в отношении вируса герпеса. На основе сопоставления обоих видов противовирусной активности планировали отобрать вещества, перспективные для разработки новых фармацевтических субстанций наружного применения и выполнить исследование их эффективности при экспериментальном кожном герпесе лабораторных животных.

Материалы и методы исследования. Новые секотритерпеновые производные синтезированы в Институте технической химии (филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского Отделения РАН). Бетулин (сырец, полуфабрикат из бересты) получен из Института органического синтеза Уфимского Научного Центра РАН.

Исследуемые вещества предварительно растворяли в 10 % этаноле (маточный раствор с концентрацией 5 мг/мл) и непосредственно перед выполнением исследования разводили средой поддержки для культуры клеток до достижения необходимой концентрации.

Использовали вирус герпеса простого I типа (ВГП-I), накопление и хранение которого выполняли общепринятыми методами. Вирусингибирующие свойства соединений изучали в экспериментах на культуре клеток рабдомиосаркомы человека (RD).

Монослойную культуру клеток, выращенную во флаконах, отмывали от ростовой среды, инфицировали 0,01–0,001 ТЦИД₅₀/клетка ВГП-I путем нанесения разведения вирусосодержащей суспензии в объеме 0,1 мл на 1 ч при 37°C. Затем жидкость удаляли и клетки покрывали средой поддержки (среда DMEM), содержащей различные концентрации исследуемых веществ. После 48–72 ч инкубации при 37°C регистрировали морфологические изменения монослоя клеток (цитопатический эффект вируса, увеличение ×80). Титр вируса в присутствии исследуемых веществ и в контроле рассчитывали в lg ТЦИД₅₀ (50 % тканевая цитопатогенная инфицирующая доза).

Критерием противовирусного действия считали наличие различий титра вируса в сравнении с контролем. Обработку полученных данных выполняли общепринятыми в вирусологии методами определения числа инфекционных единиц, Рида и Менча,

статистики для малых значений n в негруппированном ряду данных (Семенов Б.Ф., 1965; Рокицкий П.Ф., 1981). Концентрации 50 и 90 % подавления размножения вируса в присутствии изучаемого вещества (EC_{50} и EC_{90}) определяли на основе пробит-анализа и взвешенной линейной регрессии (Fung K.P., 1989). Отношения максимальная переносимая концентрация (МПК)/ EC_{50} и МПК/ EC_{90} использовали в качестве величин, свидетельствующих о широте диапазона активных нетоксичных концентраций вещества. МПК определяли как максимальную концентрацию вещества, не оказывающую влияния на морфологию неокрашенной культуры клеток.

О вирулицидных свойствах соединений судили по остаточной инфекционности ВГП-I после контакта вирусосодержащей жидкости с растворами (суспензиями) веществ. Суспензию исследуемого вещества (0,8 мг/мл) объединяли с неразведенной суспензией вируса и выдерживали при комнатной температуре в течение заданного времени. После завершения экспозиции готовили последовательные десятикратные разведения смеси на поддерживающей среде и инфицировали ими выращенную монослойную культуру клеток (во флаконах или в лунках планшет для культур клеток). После инкубации регистрировали морфологические изменения монослоя клеток и вычисляли титр вируса. Критерием наличия вирулицидного действия считали различие в титре вируса в сравнении с группой без экспозиции (точка «0»). Вычисляли время достижения 50 и 90 % вирулицидного действия (ET_{50} и ET_{90} соответственно).

Экспериментальный кожный герпес мышей воспроизводили согласно методу, описанному Boyd M.R. et al. (1988), с некоторыми изменениями, имеющими отношение в основном к способу наркотизации и используемому штамму вируса. Животных наркотизировали эфиром до начала стадии засыпания. Внутреннюю поверхность правой ушной раковины каждой мыши скарифицировали инъекционной иглой, затем наносили 20 мкл вирусосодержащей жидкости (среда DMEM с 10 % сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота). Лечение животных начинали на следующий день и продолжали в течение 5 дней. Использовали экспериментальную мазь на вазелиновой основе, содержащую 2 % исследуемого вещества. Мазь наносили 3 раза в день, о ее эффективности судили по степени развития признаков поражения в сравнении с контрольной группой животных, лечение которых выполняли только мазевой основой. Подробное описание метода приводилось нами ранее [9, 10]. Содержание животных и выполнение манипуляций на них проводили в соответствии с Законом Республики Беларусь «Об обращении с животными», Постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31.10.2006 № 131 "Об утверждении Санитарных правил и норм 2.1.2.12–18–2006 "Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)" с изменениями и дополнениями на 1 января 2014 г.

Результаты исследования и обсуждение. Выполнено исследование противовирусных свойств 27 секотритерпеноидов. Среди исследованных веществ 12 обладали вирусингибирующими свойствами, 6 веществ — вирулицидными свойствами. Среди тритерпеноидов, обладающих обоими видами активности одновременно, выявлены два соединения-лидера, первое (соединение I) — лидер по вирусингибирующей активности, второе (соединение II) — лидер по вирулицидной активности (таблицы 1, 2). Вирусингибирующими и вирулицидными свойствами обладал также препарат сравнения, бетулин.

Таблица 1. — Вычисленные показатели ингибирующего действия исследованных веществ в отношении репродукции ВГП-I

Вещество	Концентрация*, мг/мл	Титр вируса±Sx, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Разность с контролем, lg ТЦИД ₅₀ /мл	EC ₅₀ (I ₉₅) / EC ₉₀ (I ₉₅), мг/мл	Отношения МПК/EC ₅₀ / МПК/EC ₉₀
I	200	<6,0	>2,10	10,7 (11,4÷10,1)	18,7
	100	<6,0	>2,10		
	50	<6,0	>2,10	15,1 (16,0÷14,3)	13,2
	25	6,37±0,3	1,73		
	12,5	7,45±0,42	0,65		
	6,25	8,10±0,49	0		
	0	8,10±0,49	—		
II	200	6,48±0,093	1,7	44,5 (47,7÷41,4)	4,5
	100	7,18±0,27	1,0		
	50	7,39±0,33	0,79	83,7 (89,9÷78,0)	2,4
	25	8,18±0,26	0		
	12,5	8,18±0,26	0		
	6,25	8,18±0,26	0		
	0	8,18±0,26	—		
Бетулин	100	<6,0	>2,12	15,7 (16,7÷14,8)	6,4
	50	<6,0	>2,12		
	25	7,0±0,53	1,12	23,6 (25,1÷22,3)	4,3
	12,5	8,0±0,53	0,12		
	6,25	8,12±0,50	0		
	0	8,12±0,50	—		

Примечание: * максимальная из приведенных соответствует МПК.

Из данных, приведенных в таблицах, видно, что соединение I при высокой вирусингибирующей активности проявило умеренную вирулицидную активность. Соединение II при умеренной вирусингибирующей активности являлось лидером по вирулицидным свойствам.

Бетулин по вирусингибирующей активности занимал среднее положение, и по полученным результатам был ближе к соединению II. По вычисленным показателям вирулицидных свойств он был сравним с соединением I, хотя и превосходил его в величине снижения инфекционности вируса за 30 и 60 мин экспозиции.

Исследования на лабораторных животных выполнены в ограниченном объеме, и полученные данные следует считать предварительными. Тем не менее, они показывают, что при экспериментальном кожном герпесе белых мышей применение 2 % мази соединения I приводит к уменьшению выраженности признаков поражения в сравнении с применением мазевой основы. Эффективностью при данной инфекции обладает также мазь бетулина.

Таблица 2. — Вычисленные показатели вирулицидного действия исследованных веществ в отношении ВГП-I

Вещество	Экспозиция, мин	Титр вируса±Sx, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Разность с экспозицией «0», lg ТЦИД ₅₀ /мл	Разность с контролем вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	ET ₅₀ /ET ₉₀ (I ₉₅), мин
II	0	6,92±0,54	—	1,26	1,5
	15	5,15±0,46	1,77	3,03	(1,6÷1,5)
	30	3,94±0,52	2,98	4,24	3,9
	60	3,05±0,52	3,87	5,13	(4,1÷3,8)
I	0	8,18±0,26	0	0	11,8
	5	8,18±0,26	0	0	(12,9÷10,7)
	15	7,3±0,32	0,88	0,88	27,4
	30	7,18±0,26	1,0	1,00	(30,1÷24,9)
	60	6,93±0,54	1,25	1,25	
Бетулин	0	8,18±0,26	—	0	11,2
	15	7,64±0,46	0,54	0,54	(12,1÷10,4)
	30	5,3±0,32	2,88	2,88	21,9
	60	5,11±0,52	3,07	3,07	(23,6÷20,3)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что тритерпеновые соединения, как природные, так и синтетические, могут обладать двумя видами противовирусных свойств: вирусингибирующим и вирулицидным. Сочетание обоих видов противовирусной активности открывает дополнительные возможности использования тритерпеноидов в качестве лекарственных средств. Наиболее удачные соединения могут быть применены в качестве субстанций фармакологических композиций наружного применения, предназначенных для лечения герпетической инфекции (герпес простой, герпес опоясывающий).

Полученные данные могут представлять и научный интерес, поскольку механизм противовирусного действия тритерпеноидов связывают с вмешательством в репродукцию вируса, их вирулицидные свойства не установлены [7, 8].

Тема НИР выполняется при финансовой поддержке Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных Исследований, договор № M16P-012 от 20.05.2016 г.

Литература

1. Подавление репродукции вируса герпеса простого I типа с мутациями в генах тимидинкиназы и ДНК-полимеразы / Г. А. Галегов [и др.] // Генетика. — 1986. — Т. 22, № 6 — С. 892–894.
2. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities / J. B. Sindambiwe [et al.] // J. Ethnopharmacol. — 1999. — Vol. 65, № 1. — P. 71–77.
3. Противовирусные свойства распространенных лекарственных растений / Е. И. Бореко [и др.] // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологические аспекты: материалы междунар. конф. 8–9 окт. 2002 г. — Минск: Несси, 2002. — С. 343–355.
4. Badam, L. *In vitro* antiviral activity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses / L. Badam, S. P. Joshi, S. S. Bedekar // J. Commun. Dis. — 1999. — Vol. 31, No. 2. — P. 79–90.
5. Aiken, C. Betulinic acid derivatives as HIV-1antivirals / C. Aiken, C. Ho Chen // Tr. Mol. Med. — 2005. — Vol. 11, No.1. — P. 31–36.

6. New small-molecule inhibitor class targeting human immunodeficiency virus type 1 virion maturation / W. S. Blair [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2009. — Vol. 53, No. 12. — P. 5080–5087.

7. De Clercq, E. The emerging role of fusion inhibitors in HIV infection / E. De Clercq // *Drugs R. D.* — 1999. — Vol. 2, No. 5. — P. 321–331.

8. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication / N. M. Heidary [et al.] // *Phytomedicine.* — 2014. — Vol. 21, No. 11. — P. 1273–1280.

9. Бореко, Е. И. Сравнительная эффективность противогерпетических препаратов наружного применения при экспериментальном кожном герпесе белых мышей / Е. И. Бореко [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология и иммунология): материалы НИИ эпидемиол. и микробиол. по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» 2001–2005 гг. / ГУ «НИИ эпидемиол. и микробиол.» ; редкол. : Л. П. Титов [и др.]. — Минск, 2005. — С. 430–437.*

10. Бореко, Е. И. Сравнительная противовирусная активность нативных тритерпеноидов / Е. И. Бореко, Н. И. Павлова, О. В. Савинова // *Здравоохранение.* — 2014. — № 10. — С. 65–68.

SECOTRYTHERPENE COMPOUNDS AS HERPES VIRUS INHIBITORS

E. I. Boreko, O. V. Savinova

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

The object of the study was the substances obtained as a result of synthetic transformations of the plant pentacyclic triterpene alcohol betulin (substituted seco-triterpenes) from the Institute of Technical Chemistry (branch of the Federal State Budgetary Institution of Science "Perm Federal Research Center" of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. The antiviral properties of 27 compounds have been studied. Herpes simplex virus type 1 (strain 1 C) and human rhabdomyosarcoma cell line were used. Virus-inhibiting properties (the ability to suppress the reproduction of the virus) were examined by adding to the cell culture a maintenance medium with substances previously dissolved in it immediately after infection. Virucidal properties were defined as the residual infectivity of the virus after the contact of the virus-containing liquid with solutions (suspensions) of substances. Among the substances studied, 12 substances possessed virus-inhibiting properties and 6 substances virucidal properties. Among the triterpenes with both types of activity simultaneously, two leader compounds have been identified, the first one is the leader in virus-inhibitory activity, the second is the leader in virucidal activity. Betulin possessed virus-inhibiting and virucidal properties also. In preliminary studies on laboratory animals, it has been established that with experimental cutaneous white-mouse herpes, the application of 2 % ointment of the first of the triterpenes leads to a decrease in the severity of the signs of damage in comparison with the application of the ointment base. The effectiveness of this infection was also betulin ointment. The research is carried out with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Basic Research, contract No. M16R-012 of May 20, 2016.

Keywords: secotriterpenes, herpes simple virus, virus-inhibiting properties, virucidal properties, experimental cutaneous herpes.

Поступила 31.08.2017

СКРИНИНГ-ТЕСТ: БЛЯШЕЧНЫЕ МУТАНТЫ ВИРУСОВ В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Е. И. Бореко, Н. И. Павлова, Г. В. Владыко

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

Резюме. Приводится анализ частоты образования бляшечных мутантов вирусов при исследовании противовирусных свойств агар-диффузионным методом «скрининг-тест». Феномен проявляется в виде концентрической зоны бляшек, отличающихся четкостью и размером, вокруг центра-источника исследуемого вещества. Образование бляшечных мутантов наблюдали в 881 случае при исследовании 9 279 веществ (9,5 %). Наиболее частое проявление феномена имело место в исследованиях с РНК-вирусами болезни Ньюкастла (33,59 % всех случаев), гриппа FPV/Rostock (19,64 %), везикулярного стоматита (19,41 %), и было сравнительно редким с вирусом Венесуэльского энцефаломиелита лошадей, ротавирусом, вирусом парагриппа 3 типа и респираторно-синцициальным вирусом, вирусом ECHO 6 (5,90; 1,48; 1,14 и 1,02 % соответственно). Ситуация с ДНК-вирусами привлекает внимание высокой частотой образования бляшечных мутантов при исследовании с вирусом герпеса простого I типа (16,46 %), практически на уровне РНК-вирусов гриппа FPV/Rostock и везикулярного стоматита, в то время как с вирусом оспенной вакцины явление было редким (1,36 %). Обсуждаются использование различных культур клеток (эмбриональные первичные, пассируемые, линии клеток) и высокий генный полиморфизм как возможные причины наблюдаемых различий. Бляшечные мутанты вируса гриппа, полученные в присутствии высоких концентраций алициклических производных с противовирусным действием (ремантадин, амантадин и др.) охарактеризованы на фенотипическом уровне более подробно. При высокой репродукционной активности в присутствии высоких концентраций веществ они отличаются снижением основных морфо-функциональных признаков, характерных для полноценного потомства вирусов гриппа.

Ключевые слова: бляшечные мутанты, агар-диффузионный метод, ДНК- и РНК-вирусы, противовирусные свойства

Введение. Исследование на культуре клеток является основным тестом экспериментального доказательства наличия противовирусных свойств различных веществ. Со времени разработки метода культур клеток основные принципы определения противовирусных свойств существенно не изменились, совершенствовалась лишь техническая сторона вопроса, чему способствовало расширение спектра культур, появление новых питательных сред и лабораторной посуды, создание устройств, позволяющих автоматизировать процесс. Современный подход к исследованию противовирусных свойств чаще всего состоит в определении инфекционного титра тест-вируса в присутствии диапазона заданных концентраций вещества в поддерживающей среде, что позволяет выразить параметры установленного эффекта количественно. С учетом новых возможностей и при наличии современного оборудования такое исследование не вызывает затруднений даже в больших объемах.

В прежние времена исследованию заданных концентраций веществ предшествовало «просеивание» с использованием предварительных малозатратных методов. Наиболее успешным в этом плане являлся полуколичественный агар-диффузионный скрининг-тест, основанный на исследовании одной высокой концентрации вещества, при этом непрерывный радиальный градиент его концентраций, снижающихся по мере удаления от центра-источника, создавался за счет диффузии в плотном агар-содержащем питательном покрытии. О противовирусных

свойствах в таком исследовании судили по наличию и диаметру зоны ингибирования вирусных бляшек.

В минувшие годы нами с использованием этого метода был выполнен скрининг противовирусных свойств различных новых и известных химических и природных соединений, а также многих лекарственных средств и растений. Выявлены сотни веществ, активно ингибирующих репродукцию вирусов-представителей восьми семейств возбудителей наиболее распространенных инфекций [1].

Оказалось, что данный метод позволяет устанавливать не только противовирусные свойства исследуемых веществ. Вследствие того, что для исследования использовалась исходно высокая концентрация вещества, вблизи центра-источника иногда образовывалась зона вирусных бляшек с повышенной четкостью и размером, свидетельствующих об усилении репродукции вируса. Настоящая работа представляет собой анализ таких наблюдений.

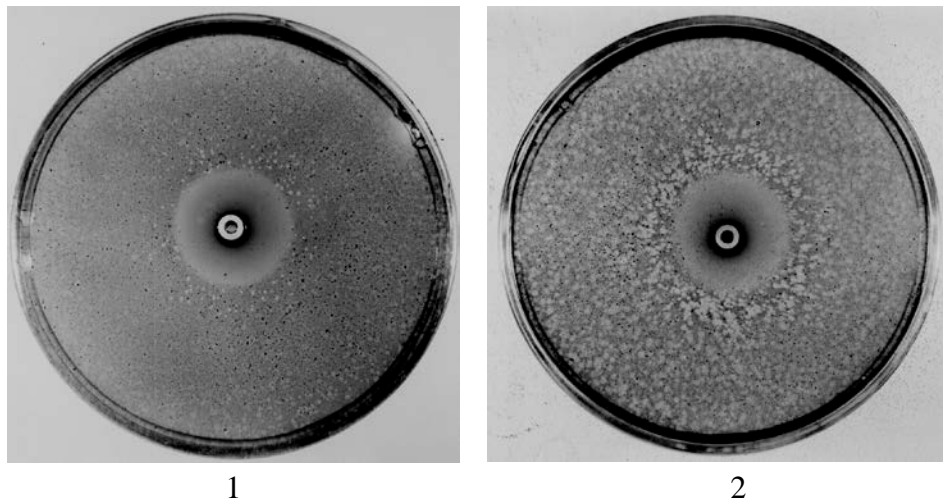
Материалы и методы исследования. Синтетические соединения и продукты природного происхождения были получены из ряда научных учреждений бывшего СССР (всего более 100). Лекарственные растения, в основном из состава флоры Беларуси, предоставлены Могилевским медучилищем, Минским мединститутом, Республиканской базой лектехкоопсырья, Борисовским химико-фармацевтическим заводом, а также Институтом фитотерапии и натуральной медицины. Лекарственные средства разных фармакологических групп приобретены в аптечной сети (1989–1992 гг.) и получены от ОАО «Белмедпрепараты» (1998–2000 гг.).

Исследуемые вещества и препараты предварительно растворяли в бидистиллированной воде, этаноле или диметилсульфоксиде в соответствии с паспортными данными о растворимости (исходный раствор с концентрацией 5 мг/мл; для веществ, не растворимых в воде, содержание этанола или диметилсульфоксида — 10 %). Водные настои лекарственных растений готовили по стандартной прописи (10,0 : 200,0) непосредственно перед исследованием.

В работе использованы вирусы герпеса простого I типа (ВГП-1; штамм 1 С), оспенной вакцины (ВОВ; штамм Б-51), классической чумы птиц (ВКЧП, вирус гриппа FPV/Rostock/34 (H7N1)), болезни Ньюкастла (ВБН), парагриппа 3 типа (ВПГ-3), респираторно-синцитиальный (РСВ; штамм Long), везикулярного стоматита (ВВС; штамм Индиана), Венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВВЭЛ; штамм ВЭЛ-230), ротавирус (штамм SA-11), вирус ЕСНО 6, полученные из Национальной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Института гриппа РАМН и музея вирусов НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь. Накопление и хранение вирусов выполняли общепринятыми методами.

Вирусингибирующие свойства соединений изучали в экспериментах: с РСВ, ротавирусом и вирусом ЕСНО 6 — на перевиваемых клетках легкого кролика (RL-33), клетках почки макаки резус (МА-104) и кожно-мышечных или легочных клетках эмбриона человека соответственно, с ВПГ-3 — на линиях клеток HeLa или Нер-2, с ВГП-1, ВОВ, ВКЧП, ВВС, ВВЭЛ — на первичной культуре фибробластов эмбрионов кур (ФЭК). Первичное определение противовирусных свойств выполняли методом «скрининг-тест». Монослойные культуры клеток, выращенные на 100 мм чашках Петри, отмывали от ростовой среды и инфицировали 0,0001–0,00001 БОЕ/клетка вируса. После 1–2 час контакта с вирусосодержащей жидкостью монослой клеток покрывали расплавом питательной среды на основе концентрата среды 199 с добавлением 1 % бактагара и 0,005 % нейтрального красного (реагенты Sigma). В застывшем питательном покрытии вырезали лунки, в которые устанавливали отрезки стеклянной трубки, заполненные 0,05 мл растворов исследуемых веществ (5 мг/мл). Учет результатов проводили после появления вирусных бляшек (36–48 час инкубации

в термостате), видимых невооруженным глазом благодаря наличию в питательном покрытии витального красителя. При определении противовирусной активности измеряли диаметры концентрических зон токсичности и подавления образования бляшек вокруг источников веществ, образующихся в результате диффузии их растворов в агаровом покрытии. Бляшки вблизи центра-источника, отличающиеся от остального газона, обозначали как химио-вирус зависимые [2] (ХВБ, рисунок 1).



Бляшки, расположенные у края зоны токсичности — ХВБ; 1 — ВКЧП,
2 — вариант того же вируса, устойчивый к действию ремантадина

Рисунок 1. — Бляшкообразование вблизи центра-источника ремантадина

Результаты исследования и обсуждение. Бляшкообразование вблизи центра-источника диффузии исследуемых веществ наблюдали в 881 случае из исследований 9 279 веществ (9,5 %). Количество веществ, исследованных с разными тест-вирусами, было неодинаковым, как и количество случаев проявления таких бляшек (таблица).

Таблица — Частота случаев проявления бляшек вблизи центра-источника (ХВБ) в зависимости от тест-вируса

Тест-вирус	Количество веществ, всего	Количество веществ с ХВБ	%
ВГП-1	9 279	145	1,6
ВОВ	9 169	12	0,13
ВКЧП	9 279	173	1,9
ВБН	2 223	296	13,3
ВПГ-3/РСВ	6 551	10	0,15
ВВС	9 279	171	1,8
ВВЭЛ	9 279	52	0,6
ЕСНО 6	9 279	9	0,1
Ротавирус	2 897	13	0,45

Видно, что наиболее частое проявление описываемого феномена имело место в исследовании с ВБН (13,3 %), что может быть связано в данном случае, с одной стороны, с высокой перmissивностью системы вирус-клетка, так как использовалась наиболее адекватная культура клеток (ФЭК), и с другой стороны — с агрессивностью вируса, известного как возбудитель высококонтагиозного заболевания птиц. Значительно ниже частота образования бляшек вблизи центра-источника веществ при

использовании ВКЧП (1,9 %), хотя культура клеток в данном случае также вполне адекватна (эмбриональные клетки кур, у которых возбудитель также вызывает эпидемии и массовую гибель). Практически на таком же уровне ХВБ проявляются и с ВВС. Что касается других использованных РНК-вирусов (ВВЭЛ, ротавируса, ВПГ-3/РСВ и, особенно, ЕСНО 6), явление было редким (0,6; 0,45; 0,15 и 0,1 % соответственно), что может быть связано как с использованием перевиваемых культур клеток (для ротавируса, ВПГ-3/РСВ и ЕСНО 6), так и с особенностями вирусов. В экспериментах с безоболочечным ротавирусом и вирусом ЕСНО 6 описываемый феномен проявлялся редко. Объединяет эти вирусы, а также ВВЭЛ, с которым ХВБ проявлялись с существенно меньшим числом веществ, сравнительно меньшие размеры вирионов и кубический тип симметрии нуклеокапсида.

Еще нагляднее частота бляшкообразования вблизи источника диффузии изучаемых веществ в зависимости от использованного тест-вируса может быть представлена в виде процентного отношения к общему количеству наблюдаемых проявлений феномена (рисунок 2).

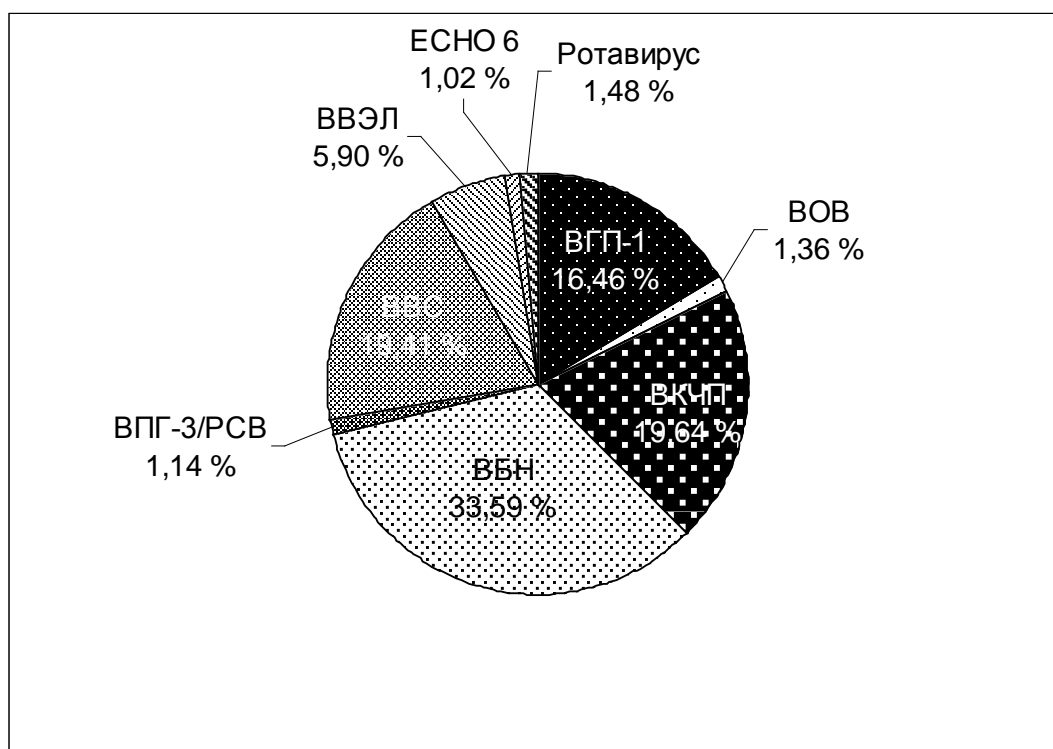


Рисунок 2. — Частота бляшкообразования вблизи источника диффузии изучаемых веществ для разных тест-вирусов

В отличие от РНК-вирусов, ситуация с ДНК-вирусами привлекает внимание высокой частотой проявления ХВБ при использовании ВВП-1, практически на уровне РНК-вирусов ВКЧП и ВВС, в то время как с ВОВ, самым крупным и сложно устроенным вирусом среди всех остальных, явление было редким, на уровне РНК-вирусов ЕСНО 6 и ротавируса. Это может быть связано с более высокой приспособленностью вируса герпеса к репродукции в использованной культуре клеток, из экспериментальной практики в вирусологии известна «всеядность» вирусов герпеса простого в отношении различных культур клеток.

С другой стороны, несмотря на то, что в целом вирусы с РНК-геномами более мутабельны в сравнении с ДНК-вирусами, известна высокая вариабельность ДНК герпесвирусов (О.В. Мосин, 2007). Это, прежде всего, вариации числа тандемных

повторов. Так, на участке, соединяющем L- и S-компоненты, и на конце L-компонента число альфа-последовательностей оказывается неодинаковым даже в потомстве, полученном из одной вирусной бляшки. Вариации второго типа проявляются в том, что в какой-то части молекул обнаруживаются сайты рестрикции, которых нет в других молекулах. Соответствующий анализ показал, что два изолята ВПП-1 или ВПП-2, выделенные из разных источников, никогда не бывают абсолютно тождественными. При размножении вируса в культуре клеток распределение сайтов рестрикции приобретает более постоянный характер [3].

Более того, при изучении устойчивости вируса герпеса простого к противовирусным средствам результаты генотипирования подтвердили, что UL23 гена тимидинкиназы ВПП-1 имеет необыкновенно высокий полиморфизм, примерно в четыре раза выше, чем у ВПП-2. Ген тимидинкиназы ВПП-2 также является высоко полиморфным по сравнению с другими локусами. Кроме того, ДНК гена *rol* изолятов ВПП-1 и ВПП-2 показывает на удивление существенный аспект полиморфизма, который не был описан ранее [4].

Таким образом, высокая частота образования бляшечных мутантов при исследовании противовирусной активности веществ методом скрининг-тест с ВПП-1 может объясняться высоким генным полиморфизмом возбудителя.

В большинстве случаев проявление феномена не сопровождалось наличием зон токсичности исследуемого вещества, а также зон ингибирования образования бляшек. Бляшкообразование вблизи центра-источника не являлось главной целью выполнения исследований, оно представляло интерес только в случае наличия у исследуемых веществ противовирусных свойств, поскольку влияло на широту диапазона нетоксических концентраций, ингибирующих репродукцию тест-вируса. Такое сочетание имело место при исследовании соединений алициклического ряда с противовирусными свойствами в отношении вирусов гриппа (лекарственные средства амантадин, ремантадин, дейтифорин, новые соединения каркасного строения).

Бляшечные мутанты вируса гриппа, полученные в присутствии высоких концентраций алициклических производных с противовирусным действием (ремантадин, амантадин и др.) охарактеризованы на фенотипическом уровне более подробно. При высокой репродукционной активности в присутствии высоких концентраций веществ они отличаются снижением основных морфо-функциональных признаков, характерных для полноценного потомства вирусов гриппа. Снижена их инфекционность, гемагглютинирующая и нейраминидазная активность. Нарушены термостабильность гемагглютинина и соотношение основных вирионных полипептидов, свидетельствующее об уменьшении доли М1-белка и малой субъединицы гемагглютинина (НА2), неполной расщепленности гемагглютинина. В совокупности с данными об интерференции с исходным вирусом это дало основание предполагать наличие мутаций в области связующего пептида гемагглютинина [5–7].

В процессе очистки и концентрирования данный вариант вируса сохраняет лишь 0,9 % своей гемагглютинирующей активности в сравнении с 8,7 % у исходного и 5,1 % — у ремантадинрезистентного вариантов. В результате снижается его плавучая плотность в градиенте концентраций хлорида цезия, что согласуется с характерной морфологией вирионов, утративших поверхностные гликопротеины [5, 6].

Метод скрининг-тест предполагает первоначальное инфицирование культуры клеток тест-вирусом, и только затем — внесение исследуемого вещества, что создает условия к проявлению бляшечных мутантов. В случае использования других методов исследования, например метода редукции бляшек (*plaque reduction assay*), где возможна обработка культуры клеток исследуемым веществом перед инфицированием и/или

одновременно с ним, феномен может быть существенно снижен, либо не проявляется вовсе.

К бляшечным мутантам относятся также гидроксibenзил-бензимидазол-зависимые и гуанидинхлорид-зависимые мутанты энтеро- и полиовирусов, известные из литературных данных прошлых лет [8, 9]. Для последних характерно исчезновение нейровирулентности, в связи с чем на этой основе предлагался новый способ получения полиовакцины.

Литература

1. Основные итоги исследования противовирусных свойств новых синтетических соединений, веществ природного происхождения и официальных лекарственных препаратов / Е. И. Бореко [и др.] // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: материалы юбил. конф. БелНИИЭМ / БелНИИЭМ; редкол.: П. Г. Рытик [и др.]. — Минск: Навука і тэхніка, 1995. — С. 153–169.
2. Вотяков, В. И. Изучение тканевой реакции и инфекционности вируса гриппа при размножении в культуре ткани в присутствии ремантадина / В. И. Вотяков, Е. И. Бореко, Л. К. Запорожец // Вопр. вирусол. — 1984. — № 4. — С. 468–473.
3. Мосин, О. В. Герпесвирусы и их репликация в клетке [Электронный ресурс] / О. В. Мосин // Журн. «Самиздат». — 2007. — Режим доступа: http://samlib.ru/o/oleg_w_m/cdocumentsandsettingsolegmoidokumentygerpes-wirusyihreplika-cijartf.shtml. — Дата доступа: 31.07.2017.
4. Testing of herpes simplex virus for resistance to antiviral drugs / A. Sauerbrei [et al.] // Virulence. — 2010. — Vol. 1, No. 6. — P. 555–557.
5. Изменение вируса гриппа при размножении в присутствии высоких концентраций ремантадина / Н. И. Карако [и др.] // Вопр. вирусол. — 1989. — № 1. — С. 43–46.
6. Бореко, Е. И. Полипептиды вируса гриппа, полученного в присутствии высоких концентраций ремантадина / Е. И. Бореко, Н. И. Павлова, В. И. Вотяков // Вопр. вирусол. — 1998. — № 6. — С. 270–274.
7. Бореко, Е. И. Изменение чувствительности вируса гриппа, размножившегося в присутствии ремантадина, к противовирусным препаратам / Е. И. Бореко, Н. И. Павлова, В. И. Вотяков // Вопр. вирусол. — 1999. — № 3. — С. 115–119.
8. Ferrari, W. The characteristic and relationship of virus resistance and dependence to guanidine chloride and other compounds / W. Ferrari, B. Loddo, G. L. Gessa // Ann. NY Acad. Sci. — 1965. — Vol. 130. — P. 404–408.
9. Dependence of echovirus 9 on the enterovirus RNA replication inhibitor 2-(alpha-Hydroxybenzyl)-benzimidazole maps to nonstructural protein 2C / D. Hadaschik [et al.] // J. Virol. — 1999. — Vol. 73, No. 12. — P. 10536–10539.

SCREENING TEST: PLAQUE VIRUS MUTANTS IN THE PRESENCE OF HIGH CONCENTRATIONS OF THE INVESTIGATED SUBSTANCES

E. I. Boreko, N. I. Pavlova, G. V. Vladyko

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

An analysis of the incidence of plaque virus mutants in the study of antiviral properties is made by the agar-diffusion method of "screening test". The phenomenon manifests itself in the form of a concentric zone of plaques differing in clarity and size around the source center of the test substance. The formation of plaque virus mutants was observed in 881 cases from studies of 9,279 substances (9.5 %). The most frequent manifestation of the phenomenon occurred in studies with RNA Newcastle disease (33.59 % of all cases), influenza A/FPV/Rostock (19.64 %), vesicular stomatitis (19.41 %) viruses and was relatively rare with the Venezuelan horse encephalomyelitis virus, rotavirus, type 3 parainfluenza and respiratory

syncytial viruses, ECHO 6 virus 6 (5.90, 1.48, 1.14 and 1.02 %, respectively). The situation with DNA viruses draws attention to the high incidence of plaque virus mutants in the study with the herpes simplex virus type I (16.46 %), almost at the level of RNA influenza A/FPV/Rostock and vesicular stomatitis viruses, while with the vaccinia virus the phenomenon was rare (1.36 %). The use of different cell cultures (embryonic primary, passable, cell lines) and high gene polymorphism are discussed as possible causes of the observed differences. Plaque mutants of the influenza virus, obtained in the presence of high concentrations of alicyclic derivatives with antiviral action (rimantadine hydrochloride, amantadine hydrochloride, etc.) are characterized at a phenotypic level in more detail. With high reproductive activity in the presence of high concentrations of substances, they are distinguished by a decrease in the basic morpho-functional features that are characteristic of a full-fledged progeny of influenza viruses.

Keywords: plaque mutants, agar diffusion method, DNA and RNA viruses, antiviral properties

Поступила 07.09.2017

О СЛУЧАЯХ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.В. Ильешева, Г.В. Садовникова, Л.В. Глебо, Л.Н.Рудая

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

Резюме. Проблема профилактики вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции на современном этапе рассматривается как одно из приоритетных направлений государственной политики в области профилактики ВИЧ/СПИД. Риск передачи ВИЧ от ВИЧ-инфицированной матери ребенку является целевым программным показателем Государственной программы «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016–2020 гг., подпрограммы № 5 «Профилактика ВИЧ-инфекции» на 2017 г. и составляет 1,7 % (за 2016 г. — 2,0 %). Несмотря на комплекс целенаправленно проводимых профилактических медицинских мероприятий, имеются объективные трудности в достижении ожидаемой эффективности, связанные с рядом поведенческих и социальных факторов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, вертикальная трансмиссия, АРВ-терапия, анализы ИФА — ВИЧ, ИБ, ПЦР-ДНК-ВИЧ.

Введение. В Брестской области профилактика передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку проводится в соответствии с приоритетом государственной политики в Республике Беларусь по предупреждению распространения ВИЧ-инфекции. В основу стратегии положены рекомендации Всемирной организации здравоохранения.

Во исполнение Государственной программы «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016–2020 гг. в области реализуется комплекс мероприятий, направленных на создание условий для укрепления репродуктивного здоровья и рождения здоровых детей ВИЧ-инфицированными матерями.

С 2003 г. профилактика перинатальной передачи ВИЧ-инфекции проводится в соответствии с требованиями действующих нормативно-распорядительных документов.

Своевременное начало и эффективность профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку при благоприятно протекающей беременности снижает риск инфицирования ребенка до 0,8–1 %.

Все беременные женщины при постановке на учет по факту беременности и в 32-недельном сроке беременности в обязательном порядке проходят тестирование на ВИЧ. Налажено обследование их мужей, сексуальных партнеров.

Мероприятия по профилактике передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку осуществляются при добровольном информированном согласии женщины. Индивидуальный подбор схемы АРВ-терапии, медицинского наблюдения, профессиональная психологическая поддержка, формирование доверительных отношений между врачом и пациенткой, приверженность к АРВ-терапии определяют состояние и качество жизни будущего ребенка.

В случае выявления ВИЧ-инфекции у беременной во исполнение действующих нормативных документов назначается медикаментозная АРВ-терапия. При родоразрешении беременной ВИЧ-инфицированной также проводится медикаментозная профилактика женщине и новорожденному.

Благодаря созданным условиям для укрепления репродуктивного здоровья и рождения здоровых детей ВИЧ-инфицированными женщинами и семьями, столкнувшимися с проблемой ВИЧ-инфекции и СПИДа, женщины с 14 недель беременности бесплатно получают антиретровирусные препараты. Детям, рожденным ВИЧ-инфицированными матерями, предоставляется бесплатное заместительное вскармливание молочными смесями на первом году жизни.

В течение 18 месяцев ВИЧ-экспонированные дети в соответствии с клиническим протоколом профилактики ВИЧ-инфекции от матери ребенку, утвержденным приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 24 сентября 2010 г. № 1008 «Об утверждении клинических протоколов» находились на диспансерном наблюдении с обязательными лабораторными обследованиями: ПЦР-ДНК-ВИЧ в 2 и 4 месяца, ИФА-ВИЧ в 9, 12, 15, 18 месяцев. В случае отсутствия признаков заболевания и наличии отрицательных результатов анализов снимались с диспансерного учета и переводились в группу «здоров».

Государственные денежные пособия назначаются семьям, воспитывающим ВИЧ-инфицированных детей в соответствии с частью четвертой статьи 20 Закона Республики Беларусь от 29 декабря 2012 г. «О государственных пособиях семьям, воспитывающим детей», назначение указанного вида пособия регулируется положением о порядке назначения и выплаты государственных пособий семьям, воспитывающим детей, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 28 июня 2013 г. № 569. Пособие на ребенка в возрасте до 18 лет, инфицированного ВИЧ назначается один раз в размере — 70 % БПМ до достижения ребенком, инфицированным ВИЧ, возраста 18 лет. Кроме пособия в размере 70 % БПМ, право на так называемое социальное пособие в размере 50 % БПМ имеют другие дети в семье, где воспитывается ВИЧ-инфицированный ребенок.

Несмотря на проводимую профилактическую работу, предпринимаемые организационные и методические действия по предупреждению вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции в области эпизодически регистрируются единичные случаи рождения ВИЧ-инфицированных детей.

Материалы и результаты исследования. В 2014 г. зарегистрирован случай вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции у ребенка К., в г. Барановичи.

Мать ребенка — гражданка Украины К. поступила в УЗ «Барановичский родильный дом» в январе 2014 г. без медицинского освидетельствования на ВИЧ в состоянии родовой активности, родила ребенка (девочку).

Результаты исследования на ВИЧ методом иммуноферментного анализа в лаборатории диагностики ВИЧ/СПИД в ГУ «Брестский ОЦГЭиОЗ» и иммунного блоттинга в референс-лаборатории диагностики ВИЧ/СПИД ГУ «Республиканский ЦГЭ и ОЗ» положительные.

Мать новорожденного ребенка не получала АРВ-терапию во время беременности и в родах. В результате проведенного служебного расследования установлено, что мать ребенка К. — гражданка Украины состояла на диспансерном учете в центре профилактики и борьбы со СПИДом Украины с 2008 г., где в 2012 г. была диагностирована 2-я клиническая стадия ВИЧ-инфекции, хронический вирусный гепатит С.

В январе 2014 г. поступила в УЗ «Барановичский родильный дом» в состоянии родовой активности, скрыв информацию о своем ВИЧ-статусе и тем самым дезориентировала медицинских работников в части тактики ведения родов. При выезде на постоянное место жительства в Республику Беларусь к мужу медикаменты ей были выданы с собой. Но как минимум за 2 месяца до родов она прекратила прием, так как они закончились. В Республике Беларусь она скрывала свой ВИЧ-статус, опасаясь осложнения семейных отношений и привлечения к уголовной ответственности за умышленное заражение мужа. Муж впоследствии был обследован на ВИЧ, результат отрицательный. В настоящее время пара является серодискордантной.

Из акушерского анамнеза: на учете в женской консультации г. Барановичи не состояла, является гражданкой Украины, обменная карта беременной не представлена. При поступлении поставлен диагноз: «Беременность 273 дня. Предвестники родов». Велось активное наблюдение за роженицей. Ребенок родился доношенным с весом 2520 г, рост 47 см. Послеродовый период протекал без осложнений, выписана с удовлетворительными клинико-лабораторными показателями. В ходе диспансерного наблюдения у ребенка были выявлены признаки ВИЧ-инфекции, выдано направление на консультацию в УЗ «Минская детская инфекционная больница», где в феврале 2014 г. диагностирована ВИЧ-инфекция, в марте 2014 г. установлена 3-я клиническая стадия — пре-СПИД, назначена АРВ-терапия.

Проведено служебное расследование данного случая с рассмотрением на медсовете УЗ «Барановичская ЦП», на заседании областной рабочей группы по профилактике передачи ВИЧ-инфекции матери ребенку при управлении здравоохранения Брестского облисполкома.

Сделаны выводы: вертикальная трансмиссия ВИЧ-инфекции у ребенка К. обусловлена отсутствием проведения медицинских мероприятий по предупреждению передачи ВИЧ от матери ребенку по вине матери, намеренно скрывавшей свой ВИЧ-статус.

В 2015 г. зарегистрировано 2 случая вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции у детей в Кобринском районе. Оба ребенка родились в семье О., где оба родителя являлись ВИЧ-инфицированными.

Мать О. состоит на диспансерном учете по поводу ВИЧ-инфекции с 2010 г. В октябре 2010 г. у нее была диагностирована 4-я клиническая стадия ВИЧ-инфекции, тяжелая иммуносупрессия, назначена АРВ-терапия. Диагноз В20, 4-я клиническая стадия, выраженная тяжелая иммуносупрессия. Согласно клиническим протоколам была назначена АРВ-терапия.

Пациентка часто выезжала в Российскую Федерацию, в связи с чем, АРВ препараты отпускались на длительный срок. Будучи беременной, являлась на диспансерный осмотр к врачу-инфекционисту в территориальную поликлинику. Беременность от лечащего врача скрывала. На учет по беременности в женской консультации не становилась.

Находясь в состоянии родовой активности, была доставлена машиной скорой помощи в Брестский областной родильный дом. Диагноз при поступлении: роды вторые срочные в 275 дней (40–41 неделя) По беременности не наблюдалась, поступила без обменной карты беременной, факт наличия ВИЧ-инфекции скрыта. В связи с неизвестным ВИЧ-статусом была обследована при помощи экспресс-теста «Креатив МП-ВИЧ 12», был получен положительный результат. ВИЧ-инфицированная с ее слов продолжала АРВ-терапию, назначенную до беременности. В родах согласно протоколу проводилась АРВ-терапия препаратом «Ретровир» матери и новорожденному. Так как ВИЧ-инфицированная беременная поступила в состоянии родовой активности, родоразрешение проведено через естественные родовые пути. Родился живой доношенный ребенок мужского пола с весом 3380 г, рост 55 см, оценка по шкале Апгар 8/8 баллов.

Признаков врожденной ВИЧ-инфекции на момент осмотра врачом-инфекционистом не отмечалось.

В апреле 2014 г., пренебрегая требованиями по проведению диспансерного наблюдения и диагностических обследований, без проведения обследований методом ПЦР-ДНК-ВИЧ, ВИЧ-экспонированный ребенок А. из семьи О., убыл с родителями в Российскую Федерацию.

В поликлинику УЗ «Кобринская ЦРБ» родители обратились в ноябре 2014 г. в возрасте ребенка 9 месяцев. В декабре 2014 г. диагностирована ОРИ, через две недели отмечено повторное повышение температуры до 39°C, появление частого водянистого стула. Ребенок направлен в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска, где он находился в период с февраля по март 2015 г., где был установлен окончательный диагноз: ВИЧ-инфекция, 2-я клиническая стадия, ПГЛ, гепатоспленомегалия, выраженный иммунодефицит.

В январе и феврале 2015 г. получены положительные результаты анализов ПЦР ДНК-ВИЧ.

Второй ребенок Б. родился в 2015 г. Мать в период беременности находилась на АРВ-терапии, в женской консультации по поводу беременности не наблюдалась, так как находилась в РФ. Поступила для родоразрешения в УЗ «Кобринский родильный дом». При проведении диспансерного наблюдения за вторым ВИЧ-экспонированным ребенком проводились лабораторные исследования методом ПЦР—ДНК—ВИЧ в референс-лаборатории ГУ «РЦГЭиОЗ», дважды получены положительные результаты в августе и сентябре 2015 г.

Ребенок был направлен для консультации в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска, где в ноябре 2015 г. ему был поставлен диагноз: ВИЧ-инфекция, 2-я клиническая стадия, генерализованная лимфаденопатия, спленомегалия, умеренный иммунодефицит.

Проведено служебное расследование данных случаев с рассмотрением на медсовете УЗ «Кобринская ЦРБ», на заседании областной рабочей группы по профилактике передачи ВИЧ-инфекции матери ребенку при управлении здравоохранения Брестского облисполкома. Сделаны выводы о том, что вертикальная трансмиссия ВИЧ-инфекции у детей А. и Б. связана с неадекватным поведением ВИЧ-инфицированных родителей, пренебрежительно отнесшимся к рекомендациям медицинских работников и критически не оценивающих последствия своего ВИЧ-статуса при рождении детей. Фактически родители проигнорировали медицинские рекомендации по профилактике передачи ВИЧ от матери ребенку, что привело к вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции.

В 2016 г. зарегистрировано 3 случая ВИЧ-инфекции у детей, один из которых связан с вертикальной трансмиссией, два предположительно с инфицированием в постнатальном периоде при вскармливании грудным молоком.

1. Ребенок С., родился в мае 2016 г. от ВИЧ-инфицированной матери, имевшей 3-ю беременность, 2-е роды в сроке 38–39 недель. Родоразрешение проведено методом кесарева сечения, ребенок родился с весом 2,9 кг, рост 50 см, с оценкой по шкале Апгар 8/8 баллов.

Мать В., ВИЧ-инфекция у нее была выявлена в процессе прохождения медицинского осмотра при оформлении на работу. Состоит на учете в консультативно-диспансерном кабинете УЗ «Пинская центральная поликлиника» с сентября 2014 г. До беременности АРВ-терапию не получала. В сроке 18–19 недель была назначена АРВ-терапия: дуовир + алувия, затем в связи с плохой переносимостью в сроке с 32–33 недели схема была изменена на теноф-М/эфавиренз.

При изучении причин поздней явки установлено: в женской консультации при постановке на учет по беременности пациентке на руки было выдано направление в консультативно-диспансерный кабинет, что отражено в карте медицинского наблюдения за беременной. Однако, пациентка, проявила безответственное отношение к своему здоровью и здоровью будущего ребенка и на прием в течение полутора месяцев не являлась. Приверженность к лечению низкая, терапию получала не регулярно, с перерывами. В родах ребенок получил зидовудин в/в капельно по схеме. После родов в течение 28 суток получал неврирапин, зидовир, ламивудин по схеме.

В ходе диспансерного наблюдения при проведении лабораторных обследований у ребенка четырежды были получены положительные результаты на ВИЧ: ПЦР-РНК-ВИЧ. Получены положительные результаты анализов при определении количественного теста копий РНК, провирусной ДНК.

В октябре 2016 г. комиссионно в УЗ «Пинская ЦП» выставлен диагноз: В-24. Болезнь вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) неуточненная. Сопутствующий диагноз: себорейный дерматит.

Вывод: вертикальная трансмиссия ВИЧ-инфекции у ребенка С. обусловлена пренебрежительным отношением матери к медицинским рекомендациям, недооценкой последствий собственного ВИЧ-статуса, низкой приверженностью к АРВ-терапии, выразившуюся в нерегулярном приеме назначенных АРВ-препаратов.

2. Ребенок Д., 2015 г. рождения, родился от матери, у которой ВИЧ-инфекция была выявлена в послеродовом периоде. Мать — гражданка Ж., 33 лет, состояла на диспансерном учете по беременности в филиале «Женская консультация» УЗ «Пинская ЦП». В процессе беременности согласно протокола проходила тестирование на ВИЧ: результаты анализов ИФА-ВИЧ в лаборатории СДИЗ УЗ «Пинская СПК»: от июля и октября 2014 г. отрицательные.

В январе 2015 г. была госпитализирована в УЗ «Пинский межрайонный родильный дом» с жалобами на бурное шевеление плода. Беременность в сроке 39–40 недель. Проведено оперативное родоразрешение путем операции кесарево сечение. Родился живой доношенный ребенок, женского пола массой 2980 г, ростом 48 см без видимых пороков развития. Оценка по Апгар 8/8 баллов. Женщина выписана домой вместе с ребенком в удовлетворительном состоянии.

Диспансерное наблюдение за ребенком проводилось в УЗ «Пинская ЦП», филиал «Детская поликлиника». Период новорожденности протекал без особенностей. Находилась на грудном вскармливании. Нервно-психическое развитие соответствовало возрасту.

В 2-х месячном возрасте диагностирован дисбактериоз кишечника, наблюдалась и получала лечение у инфекциониста (нерегулярно). У ребенка периодически отмечался неустойчивый стул, беспокойство, субфебрильная температура.

В возрасте 3-х месяцев девочка перенесла ОРИ, острый левосторонний отит. Получала амбулаторное лечение до выздоровления.

В мае 2015 г. при осмотре аллергологом по поводу аллергической сыпи были назначены лабораторные обследования. Обнаружено резкое снижение уровня тромбоцитов и гемоглобина. По направлению гематолога госпитализирован в детскую больницу г. Пинска.

В мае 2015 г. направлена в РНПЦ «Детской онкологии, гематологии и иммунологии» для обследования и продолжения лечения. Выставлен диагноз: тромбоцитопеническая пурпура, впервые выявленная, активная генерализованная цитомегаловирусная инфекция, анемия легкой степени, смешанной этиологии. Было назначено тестирование на ВИЧ-инфекцию. В ноябре-декабре 2015 г. получены положительные результаты анализов ИФА-ВИЧ, ИБ, ПЦР-ДНК-ВИЧ от 28.12.2015. Ребенок был осмотрен инфекционистом. Рекомендовано исключить грудное вскармливание.

С декабря 2015 г. мать ребенка игнорировала приглашения на прием к педиатру, на телефонные звонки не отвечала, была негативно настроена на патронаж медсестры, не шла на контакт с медсестрой, от обследования и посещения поликлиники категорически отказывалась. Несмотря на рекомендации, продолжала кормить ребенка грудным молоком.

В декабре 2015 г. ребенок направлен в УЗ «Городская инфекционная клиническая больница» г. Минска для уточнения диагноза и выработки тактики дальнейшего наблюдения и лечения. Выставлен диагноз: В-23.1. ВИЧ-инфекция: 2-я клиническая стадия: генерализованная лимфоаденопатия, гепатоспленомегалия, тяжелый иммунодефицит. Сопутствующий диагноз: анемия 1 ст., смешанного генеза. Рекомендовано: отмена грудного вскармливания, диспансерное наблюдение врача-инфекциониста по месту жительства, назначена антиретровирусная терапия.

При обследовании на ВИЧ родителей (в послеродовом периоде) получены положительные результаты (мать — ноябрь 2015 г., отец — апрель 2016 г.).

Вывод: причиной позднего обследования, повлекшего за собой несвоевременное установление диагноза, явилось недостаточная настороженность у медицинских работников в части раннего выявления ВИЧ-инфекции, снижение контроля за выполнением родителями рекомендаций специалистов, ненадлежащая оценка поведения родителей по обследованию ребенка. Негативной оценки заслуживает категорический отказ родителей от рекомендуемых обследований.

Ретроспективно можно предполагать, что инфицирование ребенка могло произойти в постнатальный период. Не исключается вероятность инфицирования ВИЧ матери в период лактации. Так как ребенок находился на грудном вскармливании, предположительно фактором передачи ВИЧ-инфекции послужило грудное молоко.

3. Ребенок З., 2011 г. рождения, проживает в Дрогичинском районе. Состоит на диспансерном учете в территориальной поликлинике в кабинете инфекционных заболеваний с ноября 2016 г. Был обследован на ВИЧ по эпидемиологическим показаниям (код 115) в ноябре 2016 г. в связи с выявлением ВИЧ-инфекции у матери Н. в сентябре 2016 г.

По анамнестическим данным: ребенок из цыганской семьи, от 9-й беременности без осложнений. Мать состояла на учете с 12-ти недель беременности, осмотры проводились регулярно, тестирование на ВИЧ проводилось дважды в установленные сроки декабре 2010 г. и апреле 2011 г., результаты отрицательные. Роды 6-е по счету.

физиологические в 39–40 недель, ребенок родился с оценкой по шкале Апгар 8/9 баллов. Послеродовый период без осложнений, приложена к груди на 1-е сутки. Выписана на 5-е сутки.

Ребенок отнесен к группе здоровья 2Б, группа риска по патологии ЦНС, фактор риска по тугоухости. В течение первого месяца жизни осматривалась педиатром 5 раз. В июле 2011 г. находилась на стационарном лечении в УЗ «Дрогичинская ЦРБ» с диагнозом: о. трахеит, о. ринит, неонатальная желтуха, остаточные явления.

В анамнезе у ребенка частые простудные заболевания: о. ринит, фарингит, трахеит, ларинготрахеит, бронхит, ОРЗ. Получал адекватное лечение, наблюдался. Однако, не назначено тестирование на ВИЧ.

Со слов матери в течение последнего года болела часто, за медицинской помощью не обращались, лечились самостоятельно, бесконтрольно.

После проведенного обследования на ВИЧ ребенка получен положительный результат. В декабре 2016 г. находился на стационарном лечении и обследовании в УЗ «Минская детская инфекционная больница». Ребенку назначена АРВ-терапия. Переносимость хорошая, родители привержены к АРВ-терапии. Данные иммунологического обследования — СД4 403 кл/мкл, 13,4 %, ВН — РНК ВИЧ — 6300 коп/мкл.

На основании анамнестических, объективных, лабораторно-инструментальных данных ребенку 3. выставлен диагноз: В 20. ВИЧ-инфекция, 3-я клиническая стадия, ПГЛ, гепатоспленомегалия, кандидоз, рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей, ангулярный хейлит. Умеренный иммунодефицит.

Ретроспективно можно предполагать, что инфицирование ребенка могло произойти в постнатальный период. Учитывая, что в период беременности тесты на ВИЧ у матери были отрицательными, можно предположить, что она инфицировалась ВИЧ в послеродовом периоде. Так как в течение 8-ми месяцев ребенок находился на грудном вскармливании, ВИЧ-инфицирование предположительно могло быть обусловлено посредством грудного вскармливания.

Все случаи вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции, а так же выявления ВИЧ-инфекции у детей проанализированы и рассмотрены на заседании рабочей группы профилактики передачи ВИЧ-инфекции матери ребенку при управлении здравоохранения Брестского облисполкома.

Выводы. В Брестской области во исполнение Государственной программы «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016–2020 гг. реализуется комплекс мероприятий, направленных на создание условий для укрепления репродуктивного здоровья и рождения здоровых детей ВИЧ-инфицированными матерями. Однако, регистрируются эпизодические случаи вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции, связанные с поведенческими особенностями, неадекватным отношением ВИЧ-инфицированных пациентов к своему ВИЧ-статусу, пренебрегающих медицинскими рекомендациями, имеющих низкую приверженность к АРВ-терапии. Два случая ВИЧ-инфекции у детей связаны с инфицированием в постнатальный период в процессе грудного вскармливания.

Очевидно, что необходимо принятие целенаправленных и широкомасштабных мер по профилактике передачи ВИЧ-инфекции, включающие ряд стратегий. Важное значение имеет информационно-образовательная, разъяснительная работа среди молодых людей, особенно вступающих в брак, планирующих рождение детей. На эффективность профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку существенное влияние оказывает качество проводимого консультирования по вопросам ВИЧ/СПИД, формирование доверительных отношений между врачом и пациентом. Важное значение имеет преемственность в работе между территориальными

медицинскими учреждениями по своевременному выявлению ВИЧ-инфекции у женщин репродуктивного возраста, в том числе с применением экспресс-тестирования, формированию приверженности и раннему началу АРВ-терапии у ВИЧ-инфицированных женщин во время беременности, проведению ее при родоразрешении и новорожденному, выбору способа родоразрешения, а также наблюдению за детьми в послеродовом периоде в возрасте до 1 года, с назначением тестов на ВИЧ в сомнительных случаях.

Соблюдение протоколов медицинского сопровождения ВИЧ-инфицированных беременных женщин (как в аспекте ВИЧ-инфекции в фертильном возрасте, так и беременности и родов) является стратегически важной государственной задачей.

Литература

1. Об организации мероприятий по профилактике вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции в Брестской области / О. В. Арнаутов [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. ст. / под ред. Г. М. Игнатъева. — Минск: Изд. В. Хурсик, 2010. — С. 422–423.

2. Клинические рекомендации по проведению профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери к ребенку [Электронный ресурс] / под ред. акад. Н. Н. Володина. — М., 2015. — Режим доступа : <https://minzdrav.gov-murman.ru/documents/poryadki-okazaniya-meditsinskoj-pomoshchi/profilaktikaVICH.pdf>. — Дата доступа : 14.08.2017.

3. Профилактика вертикальной трансмиссии ВИЧ-инфекции: учебный модуль разработан при содействии Детского Фонда Организации Объединенных Наций. — Минск, 2001.

4. Государственная программа «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016–2020 гг. М-ва здравоохранения Респ. Беларусь: принята пост. Совета Министров Респ. Беларусь 14.03.2016 № 200. — Минск, 2016.

DETECTION OF HIV INFECTION IN CHILDREN IN BREST REGION

E.V. Plyasheva, G.V. Sadovnikova, L.V. Glebko, L.N. Rudaya

Brest Regional Centre of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Brest, Belarus

The problem of prevention of HIV infection vertical transmission at the present stage is considered as one of the priority directions of state policy in the field of HIV/AIDS. The risk of HIV transmission from HIV-infected mother to child is the target software is an indicator of the State program "Health of the nation and demographic security of the Republic of Belarus" for 2016—2020", subprogramme No. 5 "Prevention of HIV infection", in 2017 it is 1.7 % (in the previous period was 2.0 %). Despite a set of purposefully carried out preventive health measures, there are objective difficulties in achieving the expected efficiency associated with several behavioral and social factors.

Keywords: HIV infection, vertical transmission, ARV therapy, tests, IFA — HIV, IB, PCR DNA HIV.

Поступила 14.08.2017

ГЕРПЕСВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

Э. Кравис¹, С.А. Дракина², А.С. Пинчук¹,
И.В. Шамрук¹, Т.В. Докукина¹

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья»,
Минск, Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь

Резюме. Инфекционные процессы в ЦНС часто приобретают хроническое течение, а клинически могут проявляться судорожным синдромом. Исследовано 49 образцов крови пациентов с фармакорезистентной эпилепсией. ДНК герпетических вирусов обнаружена в плазме крови у 6 пациентов. У 65,5 % пациентов определялись повышенные титры класса IgG к ВПГ, у 58,6 % — к ВЭБ, у 65,5 % — к ЦМВ по сравнению с уровнями антител к этим вирусам в контрольных образцах сывороток крови от 50 доноров, что может свидетельствовать о наличии хронической инфекции.

Ключевые слова: герпесвирусная инфекция, вирус простого герпеса, вирус Эпштейн-Барр, цитомегаловирус, вирус герпеса человека 6 типа, ПЦР, антитела.

Введение. Инфекционные заболевания нервной системы — одна из частых форм неврологической патологии, их удельный вес в общей структуре патологии нервной системы составляет около 40 %. Среди них особую роль играет герпетическая инфекция, которая составляет 10–20 % от общего числа вирусных энцефалитов. Практически все герпетические вирусы являются нейротропными, могут вызвать тяжелые формы менингитов, энцефалитов, при которых 80 % погибших нейронов не восстанавливаются. По данным разных авторов летальность от вирусного энцефалита составляет до 20 %. При этом следует отметить, что инфекционные процессы в ЦНС часто приобретают хроническое течение, а клинически могут проявляться судорожным синдромом [1].

В последние годы интерес ученых и практических врачей был прикован к менее изученному вирусу герпеса 6 типа (ВГЧ-6), который рассматривается в качестве этиологического агента возникновения фебрильных судорог у детей. По данным зарубежных авторов, на долю судорог у детей, вызванных ВГЧ-6 приходится 20–40 % [2].

Целью нашего исследования было выявление хронической нейроинфекции у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией.

Материалы и методы исследования. Исследовано 49 образцов крови пациентов с фармакорезистентной эпилепсией. Для обнаружения ДНК вируса простого герпеса (ВПГ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейн-Барр (ВЭБ) использовались тест-системы компании «Вектор-Бест» (Россия). Методом ИФА антитела к ВПГ, ЦМВ, ВЭБ определяли с использованием тест-систем этой же компании.

В качестве контроля исследовано 50 образцов крови здоровых доноров методом ИФА с целью количественного выявления IgM и IgG к ВПГ, ВЭБ и ЦМВ с использованием тест-систем «Euroimmune».

Результаты и обсуждение. Результаты молекулярно-серологических исследований у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией представлены в таблице 1. Как следует из таблицы, ДНК герпетических вирусов обнаружена в плазме крови у 6 пациентов: у 5 из них ДНК ВГЧ 6 (в двух образцах выявлены и антитела класса иммуноглобулинов М (IgM) к ВПГ и ЦМВ (1 и 1 соответственно)) и у одного ДНК ВЭБ

(в этом же образце и IgM к этому вирусу). В 5 других образцах сыворотки крови обнаружены IgM к ВЭБ и ЦМВ (2 и 3 соответственно).

Таблица 1. — Результаты молекулярно-вирусологических исследований методом ПЦР у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией

Вирусы	ДНК	Ig M
	выделено/обследовано	выявлено/обследовано
ВПГ	0/28	1/36
ВГЧ-6	5/23	н/и
ВЭБ	1/26	3/37
ЦМВ	0/29	4/37

В таблице 2 приведены результаты серологических исследований. У 65,5 % пациентов определялись повышенные титры класса IgG к ВПГ, у 58,6 % — к ВЭБ, у 65,5 % — к ЦМВ по сравнению с уровнями антител к этим вирусам в контрольных образцах сывороток крови от 50 доноров, что может свидетельствовать о наличии хронической инфекции. Полностью на антитела ко всем 3 вирусам обследован 21 пациент и у 95,2 % отмечалось повышение титров антител по отношению к контрольной группе, из них у 81 % титры были повышены к 2 и более патогенам.

Таблица 2. — Результаты выявления антител к герпетическим вирусам в сыворотке крови (ВПГ, ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ6) у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией

Антитела класса IgG	Количество положительных проб	Количество исследованных проб	%
ВПГ	19	29	65,5
ВЭБ	17	29	58,6
ЦМВ	19	29	65,5
ВГЧ-6	15	24	63,0
Сочетания антител к герпетическим вирусам			
ВПГ+ ВЭБ+ ЦМВ+ ВГЧ-6	2	21	9,5
ВПГ+ ВЭБ+ ЦМВ	5	21	23,8
ВПГ+ ВЭБ	4	21	19,0
ВПГ+ ЦМВ	2	21	9,5
ЦМВ + ВЭБ	1	21	4,8
ЦМВ + ВГЧ-6	1	21	4,8
ВЭБ + ВГЧ-6	1	21	4,8
ВПГ	1	21	4,8
ЦМВ	3	21	14,2

В связи с этим обнаружение ДНК герпетических вирусов (ВПГ, ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ6), а также антител к ним у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией не является случайностью, т.к. они могут быть не только пусковым механизмом патологического процесса, но и обуславливать прогрессирование заболевания. Характерной особенностью этих вирусов является их комбинированное нейтроиммунотропное воздействие и способность к пожизненной персистенции в организме [3]. Более того, с этими вирусами связывают развитие аутоиммунных

процессов в ЦНС. Особое значение при этом придается вирусу простого герпеса 1 и 2 типа, но могут на эту роль претендовать и другие представители семейства *Herpesviridae*, такие как ЦМВ и ВЭБ [4, 5]. Герпетические вирусы, как это было показано на модели ВЭБ, участвуют в развитии демиелинизации не за счет цитопатического действия, а в результате иммунного конфликта, при котором противогерпетические антитела повреждают клетки ЦНС вследствие так называемой «молекулярной мимикрии» (определенного антигенного сходства) аминокислотных последовательностей между основным белком миелина и белками вируса [6].

Таким образом, все перечисленные факты указывают на то, что герпетические вирусы могут быть триггером запуска аутоиммунного процесса и опосредованно влиять на образование аутоантител к рецепторам самих нейронов. Этот факт может указывать на перспективы в терапии данного контингента пациентов. Применение противовирусной во время обострения заболевания и иммунодепрессивной в виде стероидных гормонов может оказаться полезным в купировании патологической симптоматики и достижении клинической ремиссии.

Литература

1. Хронические нейроинфекции / И.А. Завалишин [и др.]. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
2. Судорожный синдром у детей: роль герпесвирусных инфекций / Л.В. Вашура [и др.]. // Детские инфекции. — 2014. — № 2. — С. 48–52.
3. Редькин, Ю.В. Биологические особенности вируса простого герпеса и возможности фармакотерапии / Ю.В. Редькин, А.Ю. Одокиенко // Успехи совр. биол. — 2006. — № 1. — С. 87–94.
4. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients / R. Zivadnov [et al.] // Neurol. Res. — 2006. — Vol. 28. — P. 262–269.
5. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study / P. Sundstrom [et al.] // Neurology. — 2004. — Vol. 62. — P. 2277–2282.
6. Рассеянный склероз // Избранные вопросы теории практики / под ред. И.А. Завалишина, В.И. Головкина. — М., 2000. — 637 с.

HERPESVIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH PHARMACORESISTENTIAL EPILEPSIA

E. Krawis¹, S.A. Drakina², A.S. Pinchuk¹, I.V. Shamruk¹, T.B. Dokukina¹

¹Republican Research & Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus;

²Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Infectious processes in the central nervous system often acquire a chronic course, and can be clinically manifested as a convulsive syndrome. Forty nine blood samples of patients with pharmacoresistant epilepsy were studied. Herpes virus DNA was detected in blood plasma in 6 patients. Elevated IgG class titers were detected in 65.5 % of patients to HSV, in 58.6 % to VEB, and in 65.5 % to CMV, in compared with antibodies to these viruses in control serum samples from 50 donors, which could indicate to chronic infection.

Keywords: herpesvirus infection, herpes simplex virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus type 6, PCR, antibodies.

Поступила 12.09.2017

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ БЕССИМПТОМНОЙ ФОРМЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Р.З. Кузьяев

*ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера
Минздрава России, Пермь, Россия*

Резюме. Представлены материалы по применению реакции непрямой гемагглютинации в серодиагностике бессимптомного течения клещевого энцефалита. Исследовано 185 парных проб плазмы крови пациентов после присасывания зараженных вирусом клещей. Диагностическое нарастание титра суммарных антител установлено в $22,7 \pm 3,0$ % случаев, а IgM выявлены у $30,2 \pm 3,4$ % обследованных. Более частое обнаружение IgM произошло за счет индикации Ig этого класса у части людей со стабильными титрами суммарных антител и при их снижении.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, бессимптомное течение, серодиагностика, IgM.

Введение. Открытие клещевого энцефалита на Дальнем Востоке 80 лет назад участниками научной экспедиции Наркомздрава СССР, возглавляемой академиком Л.А. Зильбером, является важнейшим этапом становления отечественной вирусологии. В течение одного эпидсезона 1937 г. была раскрыта этиология тяжелой нейроинфекции, определены основные эпидемиологические особенности, описана клиника инфекции, предложена серотерапия и обоснована нозологическая самостоятельность заболевания. Изучение клещевого энцефалита на Дальнем Востоке оказало большое влияние на развитие всей медицинской вирусологии в стране.

О возможности существования бессимптомной формы клещевого энцефалита впервые предполагалось еще в 1937 г. во время проведения на Дальнем Востоке в поселке Обор массовых осмотров жителей, у которых часто обнаруживались неврологические симптомы [1].

В разных природных очагах клещевого энцефалита бессимптомные формы значительно преобладают в структуре заболеваемости [2, 3]. В то же время бессимптомная инфекция не всегда проходит бесследно и может играть определенную роль в патологии населения эндемичных районов [4]. В некоторых случаях исходом бессимптомного течения клещевого энцефалита может быть переход в хроническую форму без предшествующего острого периода инфекции [5].

Бессимптомная форма клещевого энцефалита в настоящее время не регистрируется. Данные о манифестных формах лишь частично характеризуют эпидемический процесс. Поэтому для более полного освещения эпидемиологических особенностей клещевого энцефалита необходимо учитывать и бессимптомную форму инфекции.

Диагностика бессимптомного течения инфекции была проведена путем выявления антигена возбудителя клещевого энцефалита в крови лиц, укушенных зараженными клещами. Применение иммуноферментного анализа позволило обнаружить антигемию у пациентов в 21,4 % случаев при отсутствии клинических проявлений инфекции [6].

Лабораторная диагностика бессимптомного течения возможна также путем изучения гуморального иммунного ответа у лиц, укушенных инфицированными клещами.

Цель работы: оценка реакции непрямой гемагглютинации с унитиолом для серодиагностики бессимптомного течения клещевого энцефалита путем изучения

гуморального иммунного ответа в динамике и определения классов противоэнцефалитных антител.

Материалы и методы исследования. Для изучения гуморального ответа у пациентов с бессимптомным течением с помощью реакции непрямой гемагглютинации было организовано наблюдение за лицами, обратившимися в поликлинику по поводу присасывания зараженных вирусом иксодовых клещей. Вирусофорность переносчика определялась в иммуноферментном анализе [7]. Кровь для исследования брали у пациентов два раза с интервалом от одной до пяти недель. Всего было исследовано 185 парных проб плазмы крови людей, составивших группу повышенного риска. Антитела к вирусу клещевого энцефалита в плазме крови обследованных людей и их принадлежность к классу IgM и IgG определяли в реакции непрямой гемагглютинации с редуцентом IgM — унитиолом [8].

Полученные данные реакции непрямой гемагглютинации анализировали в трех группах наблюдаемых пациентов: 1) с диагностическим нарастанием титра антител, 2) со стабильными титрами антител, 3) с падением титра антител.

Статистическую обработку данных исследования проводили по общепринятому стандартному методу вариационной статистики [9].

Результаты исследования и обсуждение. Проведенные исследования показали, что диагностическое нарастание титра антител к вирусу клещевого энцефалита при исследовании парных проб плазмы наблюдалось у 42 человек ($22,7 \pm 3,02$ %). IgM в этой группе обследованных лиц были обнаружены в 38 случаях ($90,5 \pm 4,5$ %). Столь высокий уровень выявления IgM в крови людей в группе с серопозитивной динамикой суммарных противоэнцефалитных антител свидетельствует о возможности проведения однократного обследования пациентов с целью выявления иммунного ответа путем детекции макроглобулиновых антител в период их максимального накопления в крови.

Анализ динамики противоэнцефалитных антител показал, что антитела класса IgM появлялись в крови пациентов на первой неделе после инфицирования ($8,5 \pm 1,7$ %). Далее частота их выявления нарастала, достигала максимума на третьей неделе наблюдения ($37,8 \pm 4,0$ %). К концу наблюдения происходило понижение данного серологического показателя до низкого уровня ($4,3 \pm 2,9$ %).

Отсутствие динамики титров суммарных противоэнцефалитных антител при исследовании парных проб серологического материала (стабильные титры антител) отмечалось у 28 человек ($15,1 \pm 2,6$ %). В этой группе обследованных лиц антитела класса IgM были также обнаружены в 5 случаях ($17,8 \pm 7,2$ %). Выявление IgM в части проб плазмы со стабильными титрами суммарных иммуноглобулинов свидетельствует о возможности повышения эффективности серологического анализа с помощью метода индикации противоэнцефалитных макроглобулиновых антител.

Группу пациентов с падением титра специфических антител составили 15 человек ($8,1 \pm 2,0$ %). В плазме крови этой категории лиц IgM были обнаружены в 13 случаях, что составило высокий процент индикации ранних антител ($86,6 \pm 8,7$ %).

Сероконверсия с понижением титра суммарных противоэнцефалитных антител происходит в результате того, что, как отмечалось выше, нарастание титра IgM наблюдается только до третьей недели после инфицирования, а затем частота их обнаружения начинает снижаться. Поэтому падение титра суммарных специфических антител через некоторое время после инфицирования, по-видимому, следует рассматривать как диагностический тест, свидетельствующий о контакте человека с возбудителем клещевого энцефалита, что сопровождается ранним образованием IgM, кратковременной их циркуляцией и достаточно быстрой элиминацией из кровеносного русла или, возможно, нейтрализацией при формировании иммунных комплексов.

Быстрая элиминация IgM из крови обследуемых лиц свидетельствует о возможности защитных механизмов человека справиться с вирусом энцефалита в начальной стадии бессимптомной инфекции. Это происходит в большинстве случаев скрытого инфекционного процесса.

В редких случаях при менее доброкачественном течении бессимптомной формы клещевого энцефалита IgM могут сохраняться длительное время в крови людей, что может говорить о продолжительной персистенции возбудителя в организме без его обнаружения в крови. Следовательно, выявление IgM в крови людей из группы повышенного риска заражения в отдаленные сроки после инфицирования может быть показателем неблагоприятного исхода инфицирования вирусом клещевого энцефалита.

Исходя из этого, целесообразно проводить диспансерное наблюдение за пациентами, у которых в крови обнаруживаются IgM к вирусу клещевого энцефалита в отдаленные сроки после инфицирования (3–6 месяцев).

В целом, при исследовании в реакции непрямой гемагглютинации 185 парных проб плазмы крови людей из группы повышенного риска заражения диагностическое нарастание титра антител к вирусу клещевого энцефалита было установлено в $22,7 \pm 3,02$ % случаев, а IgM выявлены у $30,2 \pm 3,4$ % наблюдаемых лиц. Более частое обнаружение IgM произошло за счет обнаружения макроглобулиновых антител не только при нарастании титра суммарных антител, но и в некоторых случаях при стабильных титрах и падении титра специфических иммуноглобулинов. Следовательно, выявление IgM с помощью реакции непрямой гемагглютинации повышает эффективность серодиагностики бессимптомного течения клещевого энцефалита.

Выводы.

1. При исследовании в реакции непрямой гемагглютинации 185 парных проб плазмы крови людей после присасывания зараженных вирусом клещей отмечается диагностическое нарастание титра суммарных противэнцефалитных антител в $22,7 \pm 3,0$ % случаев, отсутствие динамики титров — в $15,1 \pm 2,6$ % проб и падение титра специфических иммуноглобулинов — в $8,1 \pm 2,0$ % исследуемого материала.

2. IgM к вирусу клещевого энцефалита выявляли в группе пациентов с нарастанием титра суммарных антител в $90,5 \pm 4,5$ % случаев, при отсутствии динамики суммарных антител — в $17,8 \pm 7,2$ % проб и при снижении титра специфических иммуноглобулинов — в $86,6 \pm 8,7$ % образцов плазмы.

3. Применение реакции непрямой гемагглютинации с целью обнаружения IgM в парных пробах плазмы людей после присасывания зараженных вирусом клещей повышает эффективность серодиагностики бессимптомного течения клещевого энцефалита.

Литература

1. Шаповал, А. Н. Клещевой энцефалит / А. Н. Шаповал. — Л., 1980. — 256 с.
2. Блинова, М. И. Выявление специфических антител в сыворотках крови реконвалесцентов и здоровых лиц в Томском очаге клещевого энцефалита / М. И. Блинова // *Вопр. вирусол.* — 1960. — № 5. — С. 525–528.
3. Канторович, Р. А. Опыт иммуно-эпидемиологического изучения различных типов очагов клещевого энцефалита / Р. А. Канторович, Л. И. Спицина, Г. И. Медведева // *Клещевой энцефалит и другие арбовирусные инфекции.* — М.; Минск, 1962. — С. 86–88.
4. Шаповал, А. Н. Инаппарантные формы клещевого энцефалита / А. Н. Шаповал. // *Журн. микробиол.* — 1977. — № 5. — С. 11–17.
5. Реннэ, Т. Ф. О некоторых гиперкинетических формах клещевого энцефалита с первично-хроническим прогрессивным течением — «обезглавленном» / Т. Ф. Реннэ // *Клещевой энцефалит и вирусные лихорадки.* — Омск, 1963. — С. 317–320.

6. Современные подходы к экстренной специфической профилактике клещевого энцефалита / И. В. Козлова [и др.] // *Вопр. вирусол.* — 2007. — № 6. — С. 25–30.
7. Индикация вируса клещевого энцефалита иммуноферментным методом: методические рекомендации / С. Я. Гайдомович [и др.]. — Омск, 1986. — 12 с.
8. Выявление вирусспецифических антител класса М в реакции непрямой гемагглютинации как метод ранней диагностики клещевого энцефалита / Р. З. Кузьяев [и др.] // *Журн. микробиол.* — 1991. — № 8. — С. 82–83.
9. Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологии / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев. — Л. : Медицина, 1962. — 180 с.

APPLICATION OF INDIRECT HEMAGGLUTINATION REACTION IN SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF ASYMPTOMATIC TICK-BORNE ENCEPHALITIS FORM

R.Z. Kuziaev

Perm State Medical University named after E.A. Wagner, Perm, Russia

Materials on the application of the indirect hemagglutination reaction in the serodiagnosis of asymptomatic tick-borne encephalitis are presented. One hundred eighty five 185 paired plasma samples were examined after suction of virus-infected ticks. The diagnostic increase in the titer of total antibodies was established in 22.7 % of cases, and IgM was detected in 30.2 % of the examined. More frequent detection of IgM occurred due to its indication in some people with stable titers of total antibodies and with their decrease. Therefore, IgM detection by indirect hemagglutination reaction increases the efficiency of serodiagnosis of asymptomatic tick-borne encephalitis.

Keywords: tick-borne encephalitis, asymptomatic course, serodiagnosis, IgM.

Поступила 04.07.2017

СМЕШАННАЯ КРИОГЛОБУЛИНЕМИЯ, СВЯЗАННАЯ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С: ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ, КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И ВЗАИМОСВЯЗИ

С.П. Лукашик¹, И.А. Карпов¹, Н.А. Мартусевич¹, Л.А. Анисько², В.Ф. Еремин³

¹*УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь;*

²*УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Беларусь;*

³*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь*

Резюме. Инфекция, вызванная вирусом гепатита С, широко распространена во всем мире, характеризуется высокой хронизацией, прогрессирующим течением, лимфотропностью вируса с формированием смешанной криоглобулинемии, что делает ее актуальной. В результате проведенного анализа удалось установить распространенность криоглобулинемии в исследуемой популяции пациентов в Республике Беларусь, определить клинические проявления, взаимосвязь с генотипом вируса, уточнить социальную значимость заболевания.

Ключевые слова: вирус гепатита С, криоглобулинемия.

Введение. Инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ВГС-инфекция), широко распространена во всем мире, что наряду с высокой хронизацией процесса, прогрессирующим течением в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному, лимфотропностью вируса с формированием разнообразных иммунных реакций, включая смешанную криоглобулинемию, делает заболевание актуальным не только для инфекционной гепатологии, но и возводит его в ранг междисциплинарных проблем. Современная концепция рассматривает смешанную криоглобулинемию, в первую очередь II типа, содержащую моноклональный компонент — IgMκ со свойствами ревматоидного фактора, как специфический маркер хронической ВГС-инфекции. Так после открытия вируса в 1989 г. появились доказательства того, что более 80 % случаев смешанной криоглобулинемии были связаны с ВГС-инфекцией [1–3]. Кроме того, среди пациентов с хронической ВГС-инфекцией 5–10 % с течением времени формируют клинические признаки смешанной криоглобулинемии [4, 5].

В патогенезе решающее значение имеет лимфотропность вируса гепатита С (ВГС) с преимущественным вовлечением В-лимфоцитов. Результатом взаимодействия вируса со специфическими рецепторами на поверхности В-лимфоцитов является поли/олиго/моноклональная пролиферация последних с повышенной продукцией широкого спектра аутоантител, формированием иммунных комплексов, в том числе смешанных криоглобулинов (КГ), создающих субстрат иммунологических реакций — криоглобулинемический васкулит, который лежит в основе многих системных клинических проявлений хронической ВГС-инфекции, что определяет более неблагоприятный прогноз заболевания [3]. У части пациентов (8–10 %) длительная активация В-лимфоцитов с накоплением генетических мутаций ведет к трансформации В-лимфоцитарной пролиферации в злокачественную В-клеточную лимфому [4, 5].

Несмотря на большой интерес к проблеме смешанной криоглобулинемии при хронической ВГС-инфекции многие ее аспекты остаются недостаточно изученными. До конца неясны: факторы вируса, при которых развиваются клинические проявления, неоднозначны и противоречивы результаты исследования спектра и выраженности клинических проявлений смешанной криоглобулинемии в отдельных популяциях пациентов.

Цель работы — установить распространенность смешанной криоглобулинемии у пациентов с хронической ВГС-инфекцией, уточнить частоту и спектр клинических проявлений, а также ее связь с генотипом вируса.

Материалы и методы. Исследуемая группа включала 895 пациентов с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита С, на стадии гепатита и цирроза печени, которые проходили стационарное и/или амбулаторное обследование и лечения на базе УЗ «Минская городская инфекционная клиническая больница» с января 2016 года по май 2017 года. У всех пациентов с целью скрининга забиралась кровь для выявления в ней криоглобулинов.

В последующем для анализа выбирались пациенты, имеющие хроническую ВГС-инфекцию на стадии гепатита и цирроза печени, в крови которых выявлялись криоглобулины. Всего 76 пациентов. Критериями исключения были наличие у пациентов маркеров вирусного гепатита В и ВИЧ-инфекции. Клиническими признаками криоглобулинемии считались обнаруживаемые в крови криоглобулины с по крайней мере пурпурой в качестве клинического проявления (n=41). Гистологическое подтверждение васкулита пациентам не проводилось. Основываясь на ранее сформулированных критериях, пациенты с детектируемыми криоглобулинами и васкулитом рассматривались как имеющие васкулит с поражением мелких кровеносных сосудов [6, 7].

У каждого пациента во время начального обследования регистрировались возраст, пол, а также клинические (артралгии, миалгии, вовлечение в процесс кожи, почек, нервной системы) и лабораторные данные. Лабораторные методы исследования включали общий анализ крови, биохимический анализ крови, исследование крови на криоглобулины, С4 фракцию комплемента и ревматоидный фактор. В плазме крови определялось методом ИФА наличие антител к ВГС, методом ПЦР — РНК ВГС, вирусная нагрузка, генотип вируса. Выполнялось УЗИ органов брюшной полости, у пациентов с продвинутой стадией фиброза и циррозом печени проводилась ЭГДС. Стадия фиброза уточнялась методом эластометрии. Статистическая обработка проводилась с использованием программы SPSS.

Результаты исследования. Согласно проведенному анализу выявляемость в крови пациентов с хронической ВГС-инфекцией КГ составила 8 %. В дальнейшем для достижения поставленной цели из представленных 8 % было отобрано 38 пациентов, обследованных с учетом выше указанных критериев. Средний возраст — $56,6 \pm 2,3$. Мужчин 14 (средний возраст $48,3 \pm 4,2$), женщин — 24 (средний возраст $60,9 \pm 2,6$). Исследуемую популяцию составили, в том числе, лица трудоспособного возраста: мужчины — 86 %, женщины — 38 %.

Цирроз печени, вызванный ВГС, имели 52,6 % ($n=21$) пациентов среднего возраста $59,6 \pm 2,5$: 38,1 % мужчин в возрасте $56,1 \pm 3,9$ и 61,9 % женщин в возрасте $61,8 \pm 3,2$. ХГС страдали 47,4 % ($n=17$) пациентов (средний возраст $52,8 \pm 3,9$): 35,3 % мужчин в возрасте $40,0 \pm 4,4$ и 64,7 % женщин в возрасте $59,8 \pm 4,5$, которым в последующем методом эластометрии устанавливалась стадия фиброза. Из них 35,3 % пациентов имели 3 стадию фиброза, 5,9 % пациентов — вторую стадию, 11,8 % пациентов — первую, в 23,5 % случаев фиброз отсутствовал. Эластометрия не выполнялась 23,5 % пациентов.

Для достижения поставленной цели в последующем было проанализировано наличие внепеченочных проявлений в группах пациентов, страдающих ВГС-циррозом печени и ХГС. В результате было установлено, что у 42,1 % ($n=16$) пациентов (средний возраст $58,9 \pm 3,2$): 40 % мужчин в возрасте $52,7 \pm 6,9$ и 60 % женщин в возрасте $63,1 \pm 2,0$, в крови у которых были выявлены КГ, не имели внепеченочной клинической симптоматики. Из них на стадии цирроза к моменту исследования находилось 53,3 % пациентов (средний возраст $61,1 \pm 4,6$); ХГС имели 46,7 % пациентов (средний возраст $56,4 \pm 4,5$). В то же время 57,9 % ($n=22$) демонстрировали клинические признаки, характерные для смешанной криоглобулинемии. У 59,1 % из них (23,1 % мужчин в возрасте $54,7 \pm 0,9$ лет и 76,9 % женщин в возрасте $59,9 \pm 3,8$ лет) был установлен цирроз печени, у 40,9 % — ХГС (50 % мужчин в возрасте $41,8 \pm 4,9$ лет и 50 % женщин в возрасте $58,8 \pm 10,4$ лет).

У пациентов на стадии ВГС-цирроза дополнительно были выставлены следующие диагнозы: у 23,1 % — геморрагический васкулит с поражением кожи, у 38,5 % — геморрагический васкулит с поражением кожи, почек в сочетании с синдромом Мельцера, у 7,7 % пациентов геморрагический васкулит сочетался с синдромом Мельцера и полинейропатией, у 7,6 % — обнаружен псориаз, а также анемия, В-клеточная лимфома, сетчатое ливедо (по 7,7 %, соответственно). На стадии ХГС у 22,2 % пациентов был выявлен геморрагический васкулит с поражением кожи, у 11,1 % — геморрагический васкулит с поражением кожи, почек в сочетании с дерматитом Шамберга, у 44,5 % — с синдромом Мельцера и полинейропатией, у 22,2 % — наблюдалось сочетание с красным плоским лишаем, псориазом.

В дальнейшем для оценки влияния вируса на клиническую симптоматику, мы проанализировали взаимосвязь генотипа с признаками, характерными для смешанной криоглобулинемии. Согласно полученным результатам было установлено, что в исследуемой популяции пациентов, 1 генотип вируса имели 82 % пациентов,

3 генотип — 11 % пациентов, 2 и 3a/1b генотипы наблюдались в 3 % случаев, соответственно. В 3 % случаев генотип ВГС не был определен.

Среди пациентов с 1 генотипом в 42 % случаев клиническая симптоматика, характерная для смешанной криоглобулинемии, отсутствовала. В 10 % наблюдался геморрагический васкулит с поражением кожи, в 33 % случаев — геморрагический васкулит с поражением кожи, почек в сочетании с синдромом Мельцера и пигментным дерматитом Шамберга, по 3 % случаев приходилось на клиническую симптоматику синдрома Мельцера, красного плоского лишая, В-клеточной лимфомы, в 6 % случаев был выявлен псориаз. Пациенты с 3 генотипом вируса страдали геморрагическим васкулитом с поражением кожи, имели проявления сетчатого ливедо, анемию, протеинурию (по 25 % случаев, соответственно).

Заключение. Таким образом, в исследуемой популяции пациентов с хронической ВГС-инфекцией в плазме крови с целью скрининга криоглобулины выявлены в 8 %. Наиболее частыми клиническими проявлениями криоглобулинемии были геморрагический васкулит с поражением кожи и почек, синдром Мельцера, нейропатией, реже встречались пациенты страдающие псориазом, красным плоским лишаем, дерматитом Шамберга, анемией. Клинические признаки криоглобулинемии чаще наблюдались при 1 генотипе вируса по сравнению со 2 и 3 генотипами. Выявленный в результате исследования факт вовлечения в патологический процесс лиц трудоспособного возраста требует более глубокого изучения проблемы в популяции пациентов с ВГС-инфекцией в Республике Беларусь.

Литература

1. Ragab, G. Vasculitic syndromes in Hepatitis C virus: a review / G. Ragab, M. A. Hussein // *J. Adv. Res.* — 2017. — Vol. 8. — P. 99–111.
2. Antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia / C. Ferri [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 1991. — Vol. 34. — P. 1606–1610.
3. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus / P. Cacoub [et al.] // *Am. J. Med.* — 1994. — Vol. 96. — P. 124–132.
4. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C / P. Cacoub [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 1999. — Vol. 42. — P. 2204–2212.
5. Vassilopoulos, D. Hepatitis C virus infection and vasculitis: implications of antiviral and immunosuppressive therapies [review] / D. Vassilopoulos, L. H. Calabrese // *Arthritis Rheum.* — 2002. — Vol. 46. — P. 585–597.
6. Jennette, J. C. Small-vessel vasculitis / J. C. Jennette, R. J. Falk // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — Vol. 337. — P. 1512–1523.
7. Mixed cryoglobulinemia: clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients / P. D. Gorevic [et al.] // *Am. J. Med.* — 1980. — Vol. 69. — P. 287–308.

MIXED CRYOGLOBULINEMIA, ASSOCIATED WITH CHRONIC HCV-INFECTION: FREQUENCY, CLINICAL MANIFESTATIONS AND INTERRELATIONS

S.P. Lukashyk¹, I.A. Karpov¹, N.A. Martusevich¹, L.A. Anysko², V.F. Eremyn³

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

²City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus;

³Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

HCV-infection is widespread throughout the world, characterized by high chronization, lymphotropism of the virus with the formation of mixed cryoglobulinemia.

As a result of the analysis, it was possible to establish the prevalence of cryoglobulinemia in the study population of patients in the Republic of Belarus, to determine clinical manifestations, the relationship with the genotype of the virus, and to clarify the social significance of the disease.

Keywords: hepatitis C virus, cryoglobulinemia.

Поступила 15.08.2017

ПОЯВЛЕНИЕ РОТАВИРУСОВ ГЕНОТИПА G12P[8] В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Н.В. Полякова¹, Е.О. Самойлович², Г.В. Семейко²

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь

Резюме. Согласно результатам молекулярно-генетического мониторинга впервые в 2014 г. в Республике Беларусь были выявлены ротавирусы генотипа G12P[8], продолжавшие циркулировать и в последующие годы (2015, 2016). Проведенный филогенетический анализ VP7 и VP4 генов вирусов, выявленных в 2014 и 2015 гг., показал, что они обладают близким родством по отношению друг к другу (99,8 % по генам VP7 и VP4) и принадлежат к наиболее распространенной в настоящее время подгруппе G12-3 P[8-3]. Высокая степень их гомологии (98,2–99,8 % по генам VP7 и VP4) с ротавирусами G12P[8] из других стран и существенно более низкая (95,1–96,7 %) — с ранее циркулировавшими в Республике Беларусь ротавирусами, относящимися к генотипу P[8], свидетельствует об их завозном происхождении.

Ключевые слова: ротавирусы, генов VP7 и VP4, филогенетический анализ, генотип G12P[8].

Введение. В настоящее время ротавирусы являются основными этиологическими агентами острых гастроэнтеритов у детей младшего возраста во всем мире. Ротавирусы относятся к роду *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, лишены липолисахаридной оболочки, имеют трехслойный капсид и сегментированную РНК, кодирующую 6 структурных (VP1–VP4, VP6, VP7) и 6 неструктурных (NSP1–NSP6) белков [1]. Бинарная классификация ротавирусов основана на генах, кодирующих белки наружного капсида — VP7 (G-тип) и VP4 (P-тип). К настоящему времени идентифицировано 27 G- и 37 P-генотипов ротавирусов, которые образуют 84 G[P]-комбинации, циркулирующие как в популяции людей, так и среди животных [2].

Несмотря на существующее разнообразие генотипов, до середины 1990-х гг. более 90 % случаев ротавирусной инфекции (РВИ) было обусловлено генотипами G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] [3]. Остальные генотипы встречались гораздо реже и ограничивались рамками одного или нескольких регионов мира [4]. Начиная с 2000-х гг. так называемые «common» генотипы пополнились генотипом G12P[8], который впервые был выявлен на Филиппинах в 1987 г., а спустя двадцать лет стал одним из наиболее распространенных генетических вариантов ротавирусов в мире [5]. В настоящее время удельный вес генотипа G12P[8] составляет 10,2 % в странах Африки, 4,6 % — в странах Азии, 5,3 % — в Америке [6]. В Европейском регионе удельный вес генотипа G12P[8] увеличился с 1,0 % в 2006 г. до 14,0 % в 2016 г.,

а в Испании и Италии он доминирует в генетической структуре ротавирусов, составляя 44,0 % и 37,0 %, соответственно.

В Республике Беларусь ротавирусы генотипа G12P[8] впервые были выявлены в 2014 г. в одной пробе (1,0 %), в 2015 г. — в двух (2,0 %), в 2016 г. — в трех (3,0 %). Исходя из того, что ротавирусы G12P[8] широко распространены в мире, представлялось интересным определить филогенетическое родство впервые выделенных в Беларуси ротавирусов G12P[8] с ротавирусами данного генотипа циркулирующими в мире.

Материалы и методы. Диагностика РВИ основывалась на обнаружении антигена ротавируса с использованием иммуноферментной тест-системы «РОТА-АГ» производства РНПЦ микробиологии и эпидемиологии.

Для проведения молекулярно-генетического мониторинга было отобрано 459 позитивных на ротавирус проб, выявленных в 2012–2016 гг. в г. Минске: 65 — в 2012 г., 98 — в 2013 г., 102 — в 2014 г., 103 — в 2015 г. и 91 — в 2016 г.

Выделение вирусной РНК проводили из 10 %-й суспензии проб стула, содержащих антиген ротавируса, с помощью автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAXExpress (Applied Biosystems, США) с наборами 5XMagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США) согласно инструкции производителя.

Для определения генотипа ротавируса применяли мультиплексную полугнездовую ОТ-ПЦР [7–9]. Генотипирование ротавирусов проводили по двум генам: девятому, кодирующему белок VP7 (G-генотип), и четвертому, кодирующему белок VP4 (P]-генотип). Для определения G-генотипа использовали как стандартный, так и альтернативный наборы праймеров.

Секвенирование трех штаммов генотипа G12P[8] (штамма RVA-9331, выявленного в 2014 г., и штаммов RVA-10163 и RVA-10279, выявленных в 2015 г.) проводили по девятому (VP7) и четвертому генам (VP4) на капиллярном секвенаторе (3100 Avant, Applied Biosystems, США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу Bio Edit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0.

Филогенетический анализ осуществляли с использованием алгоритма neighbor-joining посредством программы MEGA6 [10, 11]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

Результаты и обсуждение. Результаты проведенного секвенирования трех штаммов белорусских ротавирусов генотипа G12P[8] показали, что они обладают близким родством по отношению друг к другу как по гену VP7 (99,8 %), так и по гену VP4 (99,8 %). В сравнении со штаммом RVA-9331, выявленным в 2014 г, штаммы RVA-10163 и RVA-10279, выявленные в 2015 г., имели одну синонимичную замену ($G^{493} \rightarrow T^{493}$ и $G^{421} \rightarrow T^{421}$, соответственно) в последовательности гена VP7 и одну ($G^{182} \rightarrow C^{182}$ и $C^{250} \rightarrow T^{250}$, соответственно) – в последовательности гена VP4.

С целью определения происхождения белорусских ротавирусов G12P[8] в филогенетический анализ были включены ротавирусы G12P[8] и G12P[6] из различных стран мира. Сравнение нуклеотидных последовательностей белорусских штаммов со штаммами, представленными в базе данных GenBank, показало, что по гену VP7 белорусские вирусы являются близкородственными ротавирусам G12P[8] из Италии, Франции и США (98,2–99,8 %) и принадлежат к наиболее распространенной в настоящее время подгруппе G12–3 (рисунок 1). По данным литературы в данную подгруппу входит большинство ротавирусов G12 в сочетании с P[8] и P[6],

циркулирующих в настоящее время. [12]. В отличие от ротавирусов G12P[8], принадлежащих подгруппе G12-3, белорусские штаммы и штаммы из Италии, Франции и США, входящие с ними в один кластер, имели аминокислотные замены $Pe^{59} \rightarrow Val^{59}$ и $Val^{129} \rightarrow Thr^{129}$ в последовательности белка VP7.

Филогенетический анализ гена VP4 показал, что три белорусских штамма ротавируса G12P[8] принадлежат к широко распространенной подгруппе P[8]-3 и являются близкородственными ротавирусам аналогичного генотипа из Италии и США (98,2–99,8 %), однако образуют отдельный кластер. (рисунок 2). Сравнение нуклеотидных последовательностей гена VP4 белорусских ротавирусов G12P[8] с ранее циркулировавшими в Республике Беларусь (2009–2011 гг.) ротавирусами, относящимися к генотипу P[8], свидетельствуют об их высоком уровне дивергенции (3,3–4,9 %) и позволяет предполагать завозной характер ротавирусов генотипа G12P[8] на территорию Беларуси.

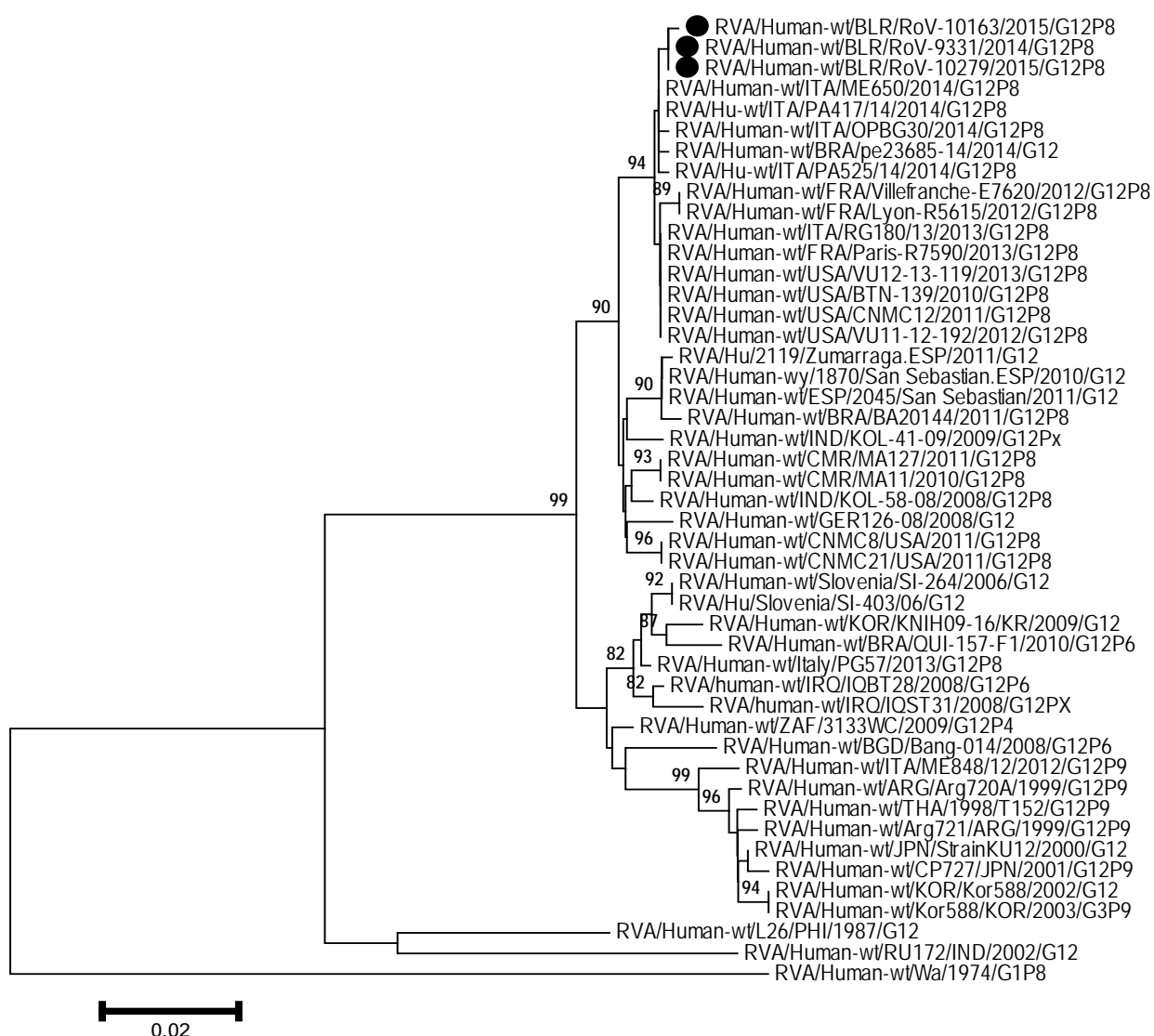


Рисунок 1. — Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP7 (730 п.н.) ● ротавирусов G12P[8], выявленных в Республике Беларусь, и ротавирусов генотипов G12 в сочетании с P[8], P[6] и P[9], выделенных в различных странах, с использованием алгоритма neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >75 %

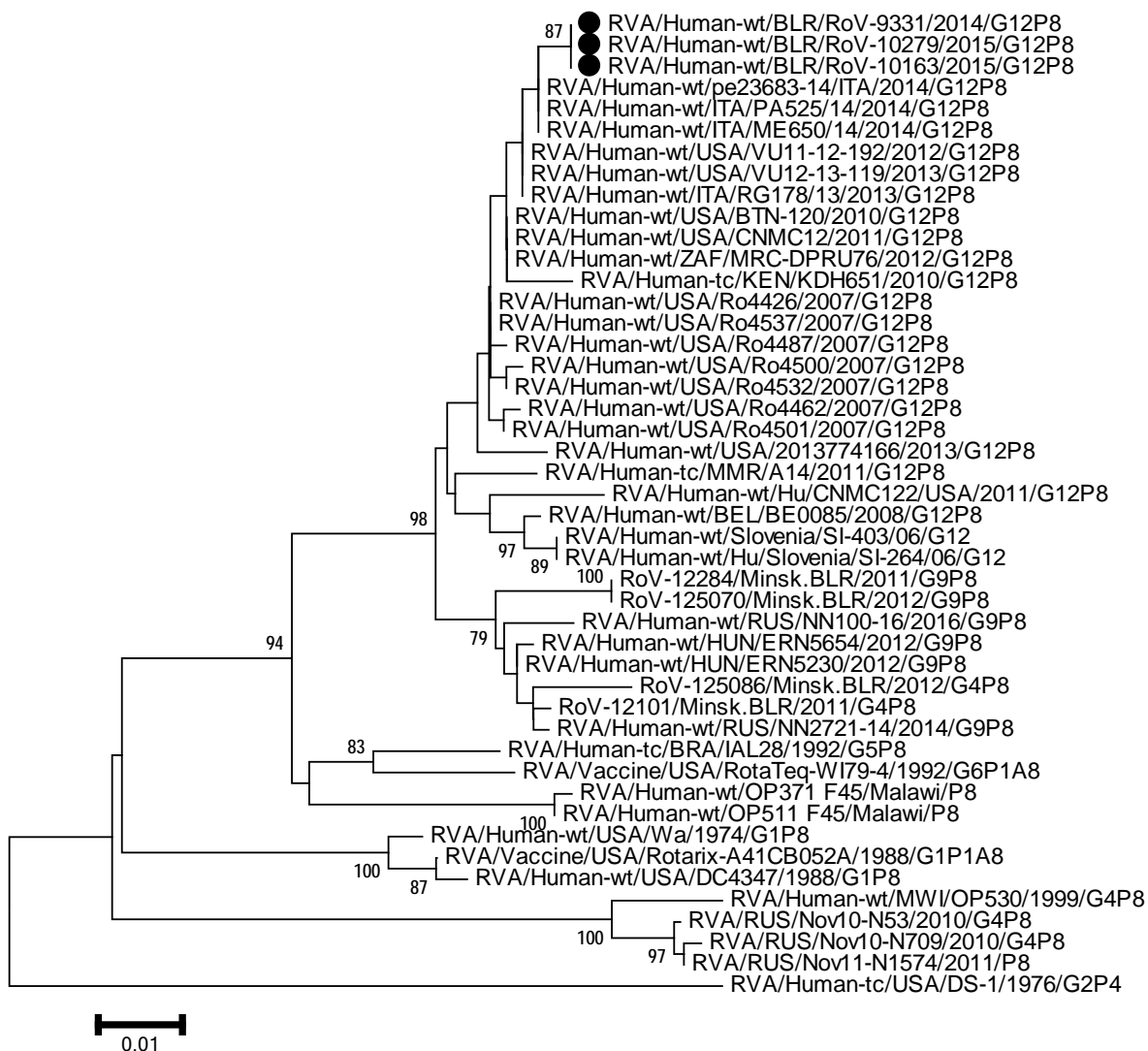


Рисунок 2. — Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP4 (618 п.н.) ● ротавирусов G12P[8], выявленных в Республике Беларусь и других странах, с использованием алгоритма neighbor-joining. Показаны индексы статистической надежности узлов дерева (перестановочный анализ с 1000 реплик) >75

Заключение. Представленные данные свидетельствуют о том, что впервые выявленные в Республике Беларусь в 2014 ротавирусы генотипа G12P[8] продолжали циркулировать и в последующие годы (2015, 2016). Молекулярно-генетический анализ вирусов, выявленных в 2014 и 2015 гг., показал, что они обладают близким родством по отношению друг к другу (99,8 % по генам VP7 и VP4) и принадлежат к наиболее распространенной в настоящее время подгруппе G12-3 P[8-3]. Высокая степень их гомологии (98,2–99,8 % по генам VP7 и VP4) с ротавирусами G12P[8] из других стран и существенно более низкая (95,1–96,7 %) — с ранее циркулировавшими в Республике Беларусь ротавирусами, относящимися к генотипу P[8], свидетельствует об их завозном происхождении.

Літэратура

1. Estes, M.K. Rotaviruses / M.K. Estes, A.Z. Kapikian // Howley Fields Virology. — 5 ed. / Eds. : D.M. Knipe, P.M. Howley. — Melbourne: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. — Ch. 52. — P. 1918—1975.
2. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains/ Matthijssens J. [et al.] // J.Virol. — 2008. — Vol. 82. — P. 3204—3219.
3. Matthijssens J. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) / J. Matthijssens, C.M. McDonald // Arch. Virol. — 2011. — Ch. 15. — P. 1397—1413.
4. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development / Gentsch J. R. [et al.] // J. of Inf. Dis. — 1996. — Vol. 174, №.1. — P. 30—36.
5. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses/ Rahman M. [et al.] // Journal of virology. — 2007. — Vol. 81, №. 5. — P. 2382—2390.
6. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? / Dóró R. [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. — 2014. — Vol. 28. — P. 446—461.
7. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30, № 6. — P. 1365—1373.
8. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India / B.K. Das [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Vol. 32, № 7. — P. 1820—1822.
9. 11. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28. — P. 276—282.
10. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. / Tamura K. [et al.] // Mol. Microbiol. — 2013. — Vol. 30. — №. 12. — P. 2725—2729.
11. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / Saitou N., Nei M. // Mol. Microbiol.. — 1987. — Vol. 4, №. 4. — P. 406—425.
12. Emergence of novel human group A rotavirus G12 strains in India / Das SJ et al] // J. Clin Microbiol. — 2003. — T. 41. — P. 2760—2762.

THE FIRST DETECTION OF ROTAVIRUS G12P[8] GENOTYPE IN BELARUS

N.V. Polyakova¹, E.O. Samoilovich², G.V. Semeiko²

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

²Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarys

The results of genetic monitoring of rotaviruses showed that genotype G12P[8] were detected in the Republic of Belarus in first time in 2014 and continued to circulate in subsequent years (2015, 2016). The phylogenetic analysis of VP7 and VP4 genes of rotaviruses detected in 2014 and 2015 reveals that they have high level of homology to each other (99,8 % for both VP7 and VP4 genes) and belong to the most common subgroup G12-3 P[8-3]. A high degree of their homology (98.2–99.8 % for the VP7 gene and 98.2–99.8 % for the VP4 gene) with rotavirus G12P[8] from other countries and significantly lower (95,1–96,7 %) — with rotaviruses of genotype P[8] previously circulating in the Republic of Belarus confirms their imported origin.

Keywords: rotavirus, VP7 and VP4 genes, phylogenetic analysis, genotype G12P[8].

Поступила 06.10.2017

ВЫЯВЛЕНИЕ БЕТА-ГЕРПЕСВИРУСОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ ФОРМОЙ ШИЗОФРЕНИИ

А.А. Штыров¹, С.В. Орлова¹, Т.В. Докукина², М.В. Мохров²

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

²ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Минск, Беларусь

Резюме. Обследованы 59 пациентов с диагнозами из блока «Шизофрения, шизотипические и бредовые расстройства» (F 20–29 по МКБ-10) на наличие генетического материала бета герпесвирусов в крови. Выявлено достоверное различие по частоте выявления герпесвирусов в крови у пациентов основной и контрольной группы. Показано, что у таких пациентов вирус 6 типа диагностируется в 25 % случаев (из них 5 % — активная форма, 10 % — латентная форма), ВГЧ-7 — 12 %, ВЭБ — 15 %, цитомегаловирус не выявлялся.

Ключевые слова: герпес человека 6 типа, герпес человека 7 типа, цитомегаловирус, вирус Эпштейн-Барра, ДНК, шизофрения.

Введение. За последние 15 лет выделены два новых антропонозных представителя семейства *Herpesviridae* — вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) и вирус герпеса человека 7 типа (ВГЧ-7), которые характеризуются многообразием клинических проявлений и бессимптомным носительством.

Инфекция, вызванная ВГЧ-6 и ВГЧ-7, занимает особое место в структуре инфекционных поражений герпесвирусной этиологии [1]. Это одни из наиболее распространенных в человеческой популяции герпесвирусов, которыми инфицировано от 60 до 90 % населения различных регионов планеты. Как и другие вирусы герпеса человека, после первичного инфицирования ВГЧ-6 и ВГЧ-7 способны персистировать в организме хозяина. Персистенция представляет собой способность герпесвирусов непрерывно или циклично реплицироваться в инфицированных клетках тропных тканей, что создает постоянную угрозу развития повторно инфекционного процесса. Кроме того, для ВГЧ-6 описаны случаи нахождения его в хромосомно-интегрированном состоянии [2, 3].

Значение ВГЧ-7 в патологии человека мало изучено. ВГЧ-7 ассоциируется с лимфопролиферативными заболеваниями, синдромами хронической усталости и иммунодефицита [1].

К заболеваниям, ассоциированным с первичной острой ВГЧ-6 инфекцией, относятся: синдром хронической усталости (миалгический энцефаломиелит); внезапная экзантема у новорожденных и более старших детей; инфекционный мононуклеоз у подростков и взрослых, не связанный с ВЭБ-инфекцией; гистиоцитарный некротический лимфаденит [1]. Реинфекция ВГЧ-6 чаще наблюдается у пациентов с нарушенным иммунным статусом, иммуносупрессией (трансплантация органов, ВИЧ и др.) или индуцируются некоторыми лекарственными средствами (антибиотики, противосудорожные средства, НПВС и др.) [3]. Обычно заболевание протекает бессимптомно, но были описаны клинические случаи, при котором встречались поражения центральной нервной системы (ЦНС) [4].

Вирус ВГЧ-6 может поражать или опосредованно влиять на ЦНС, что приводит к развитию энцефалитов, менингоэнцефалитов, асептических менингитов, фебрильных судорог, эпилептических припадков, органических психических расстройств, вплоть до прогрессирующих деменций у пациентов [5, 6]. Некоторые исследователи отмечают, что вирусы семейства *Herpesviridae* (ВГЧ-6, ВЭБ и ЦМВ) могут вызывать воспалительные изменения центральной нервной системы, которые могут проявляться

с симптомами, неотличимыми от шизофрении [7, 8]. При этом этиологическая роль ВГЧ-6 при развитии психических расстройств до конца не изучена.

Цель исследования — выявить маркеры бета герпесвирусных инфекций в периферической крови пациентов с шизофренией, шизотипическими и бредовыми расстройствами.

Материалы и методы исследования. Всего было обследовано 59 пациентов, находящихся на стационарном лечении в Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья» с диагнозами из блока «Шизофрения, шизотипические и бредовые расстройства» (F 20–29 по МКБ-10): 43 человека — шизофрения (F20), 6 человек — острые и транзиторные психотические расстройства (F23), 4 человека — шизотипические расстройства (F21), 4 человека — шизоаффективные расстройства (F25), 2 человека — хронические бредовые расстройства (F22). Для контроля использовали кровь от 20 здоровых людей.

Забор периферической крови осуществляли по стандартной методике [9]. От каждого пациента кровь забирали в два вакутейнера: с прокагулянтом (получение сыворотки) и с ЭДТА-К₂ (получение мононуклеарных клеток периферической крови). Выделение лейкоцитарной массы проводили с помощью гемолитика (Амплисенс, Россия), согласно инструкции.

Выделение генетического материала из 100 мкл сыворотки и/или лейкоцитарной массы крови осуществляли набором «Рибо-преп» (Амплисенс, Россия). Качественное и количественное выявление ДНК ВГЧ-6, ЦМВ и ВЭБ проводили наборами «ННВ6–скрин-титр-FL» и «EBV/CMV/HHV6–скрин-FL» (Амплисенс, Россия) согласно инструкции производителя. Для выявления ДНК вируса ВГЧ-7 использовали праймеры предложенные V. Tomson [10]. Постановку ПЦР проводили на приборах MJ Mini (Bio-Rad, США), Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Анализ продуктов амплификации осуществляли электрофорезом в 2,0 % агарозном геле с визуализацией на приборе Turphoon 9410 (Amersham Biosciences, Англия) в присутствии бромистого этидия [1].

Определение титра антител IgG против ВГЧ-6 в сыворотке проводили набором «ВектоННВ-6-IgG» (ВекторБЕСТ, Россия) согласно инструкции производителя.

Математическая обработка данных проводилась с использованием программы Excel и Windows XP.

Результаты исследования и обсуждение. Для анализа частоты выявления герпесвирусов были сформированы две группы: основная группа (n=59) — пациенты с диагнозами из блока «Шизофрения, шизотипические и бредовые расстройства» (F 20–29 по МКБ-10), контрольная группа (n=20) — здоровые люди. Наличие генетического материала бета герпесвирусов (ВГЧ-6, ВГЧ-7, ЦМВ) и ВЭБ определяли в каждой группе (рисунок).

Как видно из рисунка, в периферической крови у пациентов основной группы выявлялись ДНК вирусов ВГЧ-6, ВГЧ-7 и ВЭБ, а ДНК вируса ЦМВ не обнаруживалась. Общее выявление ДНК герпесвирусов в группе составило 39 % (23 пациента). По сравнению с контрольной группой, выявлялся генетический материал вируса ВГЧ-6 и ВЭБ — 10 % (2 человека). При более детальном анализе было выявлено, что в основной группе генетический материал ВГЧ-6 обнаруживался в 12 % случаях (7 пациентов), ВГЧ-7 — 3 % (2 пациента), вируса ВЭБ — 10 % (10 пациентов). Микстинфекция ВГЧ-6+ ВГЧ-7 выявлялась в 9 % случаях (5 пациентов), а ВГЧ-6+ ВЭБ — 5 % (3 пациента). Совместного выявления ДНК ВГЧ-7 и ВЭБ у пациентов не обнаруживалось. В контрольной группе частота выявления ДНК герпесвирусов составляла: ВГЧ-6 — 5 % (1 человек), ВЭБ — 5 % (1 человек).

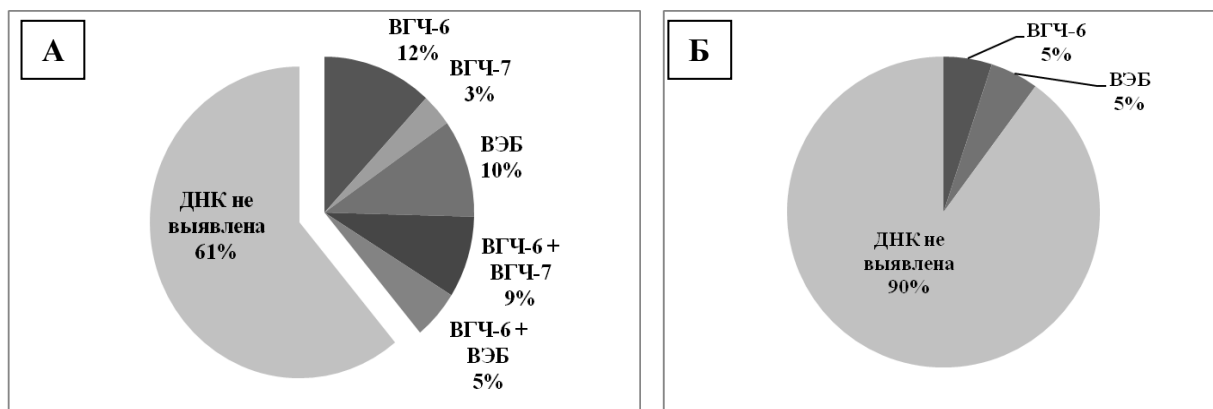


Рисунок — Диаграмма выявления ДНК вирусов герпеса в периферической крови у пациентов основной (А) и контрольной (Б) групп

Для определения разных форм инфекции детекцию ДНК ВГЧ-6 осуществляли в сыворотке (активная форма) и лейкоцитах крови (латентно/персистентная форма). Параллельно у этих же пациентов определяли количество копий ДНК ВГЧ-6 и титр антител класса IgG против ВГЧ-6. Данные представлены в таблице.

Таблица — Количественное определение ДНК ВГЧ-6 и титра антител у пациентов основной группы

Форма инфекции	Количество	Выявление ДНК ВГЧ-6		Количество копий ДНК ВГЧ-6/10 ⁵ клеток	Титр антител IgG против ВГЧ-6
		сыв-ка	лейкоциты		
активная	1	+	-	≥10 000*	≥1:200
	5	+	+	≥100 000	≥1:200
латентно/персистентная	9	-	+	≤5 000	≤1:100

Примечание: * — количество копий ДНК ВГЧ-6/ мл сыворотки

Как видно из таблицы, из 15 пациентов, у которых был выявлен вирус ВГЧ-6, девять пациентов имели латентную форму инфекции (ДНК ВГЧ-6 определялся только в лейкоцитарной массе крови), шесть пациентов имели активную форму инфекции (ДНК ВГЧ-6 определяется в сыворотке крови). Титр IgG антител равнялся 1:200 при активной форме.

Латентная форма инфекции характеризовалась низким содержанием генетического материала в крови (≤5 000 копий ДНК ВГЧ-6/10⁵ клеток) и титром антител — 1:100. Активная форма инфекции характеризовалась двумя вариантами. В первом случае, ДНК ВГЧ-6 определялась не только в сыворотке, но и в лейкоцитарной массе крови. У таких пациентов титр антител был не ниже 1:200 и в единичных случаях достигал до 1:400. Содержание генетического материала вируса в клетках крови чаще всего превышает ≥100 000 копий ДНК ВГЧ-6/10⁵ клеток. Такое состояние является показателем реактивации ВГЧ-6 после латенции. Во втором случае, ДНК ВГЧ-6 определяется в сыворотке, что указывает на вероятно первичное инфицирование этим вирусом и его репродукцию. Такое состояние характеризуется высокими титрами антител (≥1:200) и относительно высокой вирусной нагрузкой (≥10 000 копий ДНК ВГЧ-6/мл сыворотки). Полученные данные по определению вирусной нагрузки и титра антител соответствуют литературным данным [3, 11].

Выводы. Выявление маркеров бета герпес вирусов и регистрация активной и латентной форм у пациентов с различными шизофреническими расстройствами может указывать на опосредованное влияние герпесвирусов на ЦНС, что может приводить к воспалительным изменениям центральной нервной системы с симптомами, неотличимыми от шизофрении.

Литература

1. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / под ред. акад. РАН Д. К. Львова. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. — 1200 с.
2. Казимирчук, В. Е. Диагностика и лечение инфекции, вызванной вирусом герпеса 6 типа. Методические рекомендации / В. Е. Казимирчук, Д. В. Мальцев // Клинич. иммунология, аллергология и инфектология. — 2011. — № 5. — С. 33–40.
3. Никольский, М. А. Хромосомно-интегрированный вирус герпеса человека 6 типа / М. А. Никольский, В. С. Голубцова // Инфекция и иммунитет. — 2015. — Т. 5, № 1. — С. 7–14.
4. Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6,7,8-го типов [Электронный ресурс] / Е. Г. Белова, Т. К. Кускова // Мир здоровья и красоты. — 2016. — Режим доступа: <http://www.nedug.ru/library>. — Дата доступа: 22.03.2016.
5. Никольский, М. А. Роль вирусов герпеса человека 6 и 7-го типов в возникновении фебрильных судорог у детей / М. А. Никольский, М. В. Радыш // Вопр. диагностики и педиатрии. — 2012. — Т. 4, № 4. — С. 46–48.
6. Human herpesvirus 6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications and outcome / J. Rogers [et al.] // Transplantation. — 2000. — Vol. 69. — P. 2566–2573.
7. Results from a hypothesis generating case-control study: herpes family viruses and schizophrenia among military personnel / D. W. Niebuhr [et al.] // Schizophr. Bull. — 2008. — Vol. 36. — P. 1182–1188.
8. Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia / F. M. Leweke [et al.] // Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. — 2004. — Vol. 254. — P. 4–8.
9. 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.
10. Association of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 with demyelinating diseases of the nervous system / V. Tomson [et al.] // J. Neurovirol. — 2001. — Vol. 7. — P. 564–569.
11. Исаков, В. А. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика: руководство для врачей / В. А. Исаков, В. В. Борисова, Д. В. Исаков. — СПб.: Лань, 1999. — 192 с.

DETECTION OF BETA HERPESVIRUS IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

A.A. Shtyrau¹, S.V. Orlova¹, T.V. Dokukina², M.V. Mokhrov²

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;

²Republic Research & Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus

The main aim of examination was to study the frequency detection DNA of beta-herpesvirus in blood of patients with neurological disorder (schizophrenia). Fifty nine patients with schizophrenia were enrolled in the study. There was a significant difference in the frequency of detection of herpes viruses in the blood of patients and control group. It was shown that in these patients the virus type 6 was diagnosed in 25 % of cases (of which 10 % was active forms and 15 % was latent form), HHV-7 — 12 %, virus Epstein-Barr — 15 %, CMV was not detected.

Keywords: human herpes virus 6 type, human herpes virus 7 type, cytomegalovirus, virus Epstein-Barr, DNA, schizophrenia.

Поступила 28.09.2017

ОПЫТ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С HCV-ИНФЕКЦИЕЙ ПОСЛЕ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Е.Н. Яговдик-Тележная

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Резюме. Хроническая вирусная патология печени является актуальной проблемой здравоохранения в связи с широкой распространенностью, частотой поражения лиц молодого трудоспособного возраста и развитием тяжелых осложнений, таких как цирроз и рак, приводящих к летальному исходу. Среди пациентов после ортотопической трансплантации печени (ОТП) преобладали лица с минимальной клинико-биохимической активностью, уровнем вирусной нагрузки более 1000000 ME/ml, 1 генотипом ВГС, неблагоприятным полиморфизмом единичных нуклеотидов rs12979860 и rs12979860 гена ИЛ-28В. Среди пациентов, взятых на терапию после ОТП, преобладали лица с 1–2 степенью фиброза печени, что является оптимальным для достижения противовирусного ответа. Сроки от момента проведения операции до инициации терапии варьировали от 6 месяцев до 3 лет и определялись особенностью естественного течения у каждого конкретного пациента. Неопределяемый уровень вирусной нагрузки пациенты после ОТП достигают при лечении противовирусными препаратами прямого действия в сочетании с рибавирином (ПППД+Р) в более ранние сроки, чем пациенты получающие терапию пегелированными интерферонами в сочетании с рибавирином (ПИ+Р). Терапия ПППД+Р предпочтительнее у данной категории пациентов, в виду большей эффективности и меньшим количеством нежелательных эффектов.

Ключевые слова: вирус гепатита С, хроническая инфекция, ортотопическая трансплантация печени, вирусассоциированный цирроз, противовирусная терапия.

Введение. Ежегодно в мире впервые с вирусом гепатита С (ВГС, англ. HCV) встречается от трех до четырех миллионов человек. Хроническая HCV-инфекция, на сегодняшний день, диагностирована у 170 миллионов жителей планеты. Из-за осложнений, обусловленных данной инфекцией (цирроз и рак печени) регистрируется около 350 000 случаев смерти [1] и 955 000 случаев инвалидности в год [2]. Элиминация вируса, благодаря этиотропной терапии, на поздних стадиях заболевания не всегда ассоциирована с обратным развитием заболевания.

Несмотря на достигнутые успехи в лечении хронических заболеваний печени (особенно вирусной этиологии), цирроз печени остается двенадцатой по частоте причиной смерти в Соединенных Штатах и приводит к 33 539 случаям смерти в год [3]. В настоящее время около 17 000 человек ждут проведение трансплантации печени и ежегодно умирает более 1 500 пациентов, которым не осуществлена данная операция ввиду отсутствия донора. Терминальная стадия HCV-инфекции является наиболее частым показанием для проведения трансплантации печени во всем мире. Хроническая HCV-инфекция развивается у 75–90 % прооперированных, из них у 5–30 % пациентов заболевание прогрессирует в цирроз в течение 5 лет [4]. Приблизительно у 30 % пациентов течение рецидива HCV-инфекции приобретает агрессивный характер, что приводит к быстрому прогрессированию фиброза с развитием печеночной недостаточностью и гибелью пациента или необходимостью ретрансплантации [5]. Множество факторов могут влиять на скорость прогрессирования патологического процесса в трансплантате [6].

Подавление репликации ВГС у этих пациентов до или после проведения трансплантации печени, является одной из важных задач врача. Противовирусная терапия до трансплантации печени у пациентов с декомпенсированным циррозом

пегелированными интерферонами (ПИ) в сочетании с рибавирином (Р) сопряжена с низкой эффективностью [7] и высоким риском развития нежелательных эффектов, в том числе угрожающих жизни. Комбинированная терапия HCV-инфекции после проведения ортотопической трансплантации печени ПИ+Р приводит к устойчивому вирусологическому ответу (SVR) примерно у 30 % пациентов [8]. Ge D. *et al.* показал, что верификация полиморфизма единичных нуклеотидов в локусах rs8099917 гена интерлейкина 28В (ИЛ-28В) имеет существенное прогностическое значение частоты достижения вирусологического ответа при комбинированной противовирусной терапии ПИ+Р. Так наличие генотипа С/С было связано с более чем двукратным увеличением вероятности получения СВР: около 80 % для генотипа С/С, около 40 % для генотипа Т/С и около 30 % для генотип Т/Т [9].

Цель изучить эффективность различных видов противовирусной терапии у пациентов с HCV-инфекцией после ортотопической трансплантации печени в исходе вирусассоциированного цирроза.

Материалы и методы исследования. Методом сплошной выборки, с помощью программы IBM SPSS Statistics 23, создана база данных, в которую вошли пациенты, наблюдавшиеся и проходившие лечение на базе УЗ «Городская инфекционная клиническая больница».

Обследовано 59 пациентов, из них лиц мужского пола 23, что составило 38,98 %. Период наблюдения — с декабря 2010 г. по сентябрь 2017 г. Средний возраст обследованных равен 49,35±9,61 годам, минимальный — 31 год, максимальный возраст — 69 лет. Средний возраст при трансплантации равен 45,75±9,47 лет. Все пациенты являются представителями европеоидной расы.

Пациенты обследовались один раз в 3–6 месяцев в течение срока наблюдения (2010–2017 гг.). Функциональные пробы печени оценивались во время каждого посещения. В зависимости от клинических данных (наличие жалоб, внепеченочных проявлений) и биохимических показателей крови (уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ)) у пациентов определялась степень клинико-биохимической активности. Вирусная нагрузка мониторировалась на фоне проводимой терапии в зависимости от ее вида. При комбинированной терапии ПИ+Р на 4, 12, 24 месяце лечения и по ее завершению, при терапии ПППД+Р через 2, 4 недели лечения и по завершению терапии.

Ультрасонография брюшной полости и уровень альфа-фетопротеина определялись каждые 6 месяцев или, по клиническим показаниям. Определение жесткости печени проводилось с применением метода визуализации с усилением акустического импульса (ARFI), в основе которого лежит акустическая компрессия тканей (аппарат ACUSON S2000 Siemens). Динамическое наблюдение прекращалось в случае смерти пациента.

Критерии включения.

- Лица, перенесшие трансплантацию печени по поводу цирроза печени, ассоциированного с ВГС.
- Возраст старше 18 лет.

Критерии исключения.

- Лица, перенесшие трансплантацию печени, у которых не была выявлена HCV-инфекция.
- Наличие ВИЧ-инфекции.
- Наличие HBV-инфекции.

Серологическое и вирусологическое обследование. Все пациенты тестировались на наличие HCV, HBV, ВИЧ-инфекции. Иммуноферментным методом (ИФА) определяли наличие Ig total в сыворотке крови пациентов. (Набор реагентов

для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов классов G и M к вирусу гепатита C). Молекулярно-биологический метод (ПЦР) мониторировал вирусную нагрузку ВГС и определял его наличие (Набор реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса гепатита C методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Набор содержит реагенты для выделения РНК. Чувствительность: 15 МЕ/мл, Вектор-Бест, РФ). Определение генотипа проводили с использованием тест-системы производства ДНК-технология (РФ) для генотипирования (Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита C (HCV) и его генотипирования методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции ОТ—ГЕПАТОГЕН—С ГЕНОТИП).

Серонегативность ВГВ и ВИЧ определяли с помощью методов ИФА с использованием тест-систем производства Вектор-Бест (Россия) для выявления антигенов с подтверждением: набор реагентов для иммуноферментного выявления HBs-антигена вируса гепатита В (чувствительность: 0,01 МЕ/мл (нг/мл); набор реагентов для иммуноферментного выявления и подтверждения наличия антигена p24 ВИЧ-1.

Иммуносупрессивная терапия. Все пациенты получали иммуносупрессивную терапию согласно протоколам МЗ РБ и международным стандартам (такролимус, циклоспорин, метилпреднизолон — доза и сочетания индивидуальны), под контролем уровня такролимуса в крови.

Пункционная биопсия печени. Биопсии печени по протоколу проводилась ежегодно. Дополнительные биопсии печени были сделаны при необъяснимых повышениях уровня функциональных проб печени (АЛТ, АСТ, ГГТП, билирубин) и клинических проявлений для своевременной верификации острого/хронического отторжения, развития холестатического гепатита. Диагноз хронический гепатит в донорском органе верифицирован у всех 59 пациентов. Все биопсии оценивались одним патологоанатомом. Определяли гистологический индекс активности (по Knodell) и стадию фиброза.

Результаты исследования и обсуждение.

Клиническая характеристика пациентов до лечения.

В исследование включены 59 пациентов, которым проведена ОТП по поводу цирроза печени, ассоциированного с ВГС. Срок после трансплантации составил от 6 до 48 месяцев, в среднем $21,76 \pm 14,78$ месяца. Характеристика обследуемого контингента приведена в таблице.

Таблица — Характеристика обследуемого контингента

<i>Показатель</i>	<i>Значение (абс., %)</i>
Возраст при трансплантации (лет)	45,75±9,47
Возраст при обследовании (лет)	49,35±9,61
Срок после трансплантации (месяцев)	21,76±14,78
Пол (% муж)	23(38,98 %)
Диагноз до трансплантации: ЦС/ЦС+ГЦК/ЦС+алкогольный	39(66,1 %)/13(22,03 %)/7(11,87 %)
Child-Pugh	5 (размах 5–11)
MELD до трансплантации	20,09±6,8
АЛТ	131 (размах 40–654 Е/л)
АСТ	138 (размах 31–526 Е/л)
Общий билирубин	28 (размах 14–56 мкмоль/л)
Альбумин	32,8(размах 31,1–36,2 г/л)
ПТИ	0,78 (размах 0,62–0,9)

Основным фактором, послужившим поводом для проведения ОТП при более низких баллах Child-Pugh и MELD послужило выявление узлов гепатоцеллюлярной карциномы.

При обследовании установлено, что минимальная степень клинико-биохимической активности верифицирована у 39 пациентов, что составило 66,10 % от общего количества обследованных, умеренная — у 14 (23,73 %), высокая у 6 (10,17 %) пациентов. Marina Berenguer с соавторами при анализе течения HCV-инфекции у пациентов после ОТП также отмечает невысокую степень биохимической активности процесса. В тех случаях, когда выявляется стойкое повышение и/или высокие цифры АЛТ необходимо исключить одно из следующих состояний: острое (развивающееся в ранние сроки после ОТП) или хроническое отторжение донорского органа, гепатит de novo (аутоиммунный, вирусный — В, С, D, E), стеатогепатит, идиопатический посттрансплантационный гепатит, инфекции, опухоли и т.д.

Вирусная нагрузка менее 1000000 МЕ/ml определялась у 6 пациентов, что составило 15,79 % от общего числа обследованных; от 1000000 МЕ/ml до 3000000 МЕ/ml — у 38 (67,86 %), более 3000000 МЕ/ml у 12 (21,43 %).

При генотипировании ВГС, выделенных у обследуемых 1 генотип определен у 41 человека, что составило 69,49 % от общего количества обследованных, 3 генотип — у 16 (27,12 %), 2к — у двоих (3,39 %) пациентов. Проведено субтипирование возбудителя относящегося к 1 генотипу. Превалировал 1в субтип (34/82,92 % от числа пациентов с 1 генотипом), 1а выявлен в 3 (7,32 %) случаях, 1а/1в — в 4/9,76 %.

При определении однонуклеотидного полиморфизма гена ИЛ-28В rs 12979860 и rs8099917 выявлено преимущественное распространение неблагоприятных генотипов СТ/ТТ (rs 12979860) и ТG/GG (rs8099917) гена ИЛ-28В, а также их сочетания, как при HCV 1, так и 3 генотипах у пациентов, перенесших ОТП (у 34 из 45 тестируемых независимо от генотипа, что составило 75,56 %).

Всем пациентам проводилась пункционная биопсия под контролем УЗИ, с последующей оценкой степени фиброза. Фиброз 0–1 и 1 степени выявлен у 26. пациентов, что составило 44,07 % от общего числа обследованных, 1–2 и 2 степени — у 29 (49,15 %), 3 степени — у 4 (6,78 %). Результаты, полученные при проведении эластометрии, были сопоставимы с данными полученными при пункционной биопсии печени.

В зависимости, от проводимой терапии обследуемые разделены на два группы. Первую образовали 17 пациентов, что составило 28,81 % от общего количества обследованных, которые получали терапию ПИ+Р. Во вторую вошли 42 человек (71,19 %), которые в качестве этиотропной терапии получали ПППД+Р. Последняя группа бы разбита на две подгруппы: 2А и 2В. Во вторую А группу были объединены 25 пациентов, что составило 42,37 % от общего количества обследованных, которые не получали противовирусную терапию до назначения препаратов ПППД+Р. Лица (17/28,82 %), прошедшие курс противовирусной терапии (ПИ+Р) до лечения ПППД+Р сформировали 2В группу. Длительность противовирусной терапии при использовании ПИ+Р планировался в среднем на 48 недель, однако у части пациентов он сокращался до 12 недель (при присоединении софасбувира) или удлинялся до 18 месяцев при позднем вирусологическом ответе. Сроки лечения препаратами ПППД+Р также варьировали от 12 до 24 недель.

Инициация противовирусной терапии проводилась в среднем на $19,87 \pm 14,73$ месяце наблюдения после проведения ОТП. Согласно литературным данным оптимальные сроки для инициации противовирусной терапии ПИ+Р рассматриваются большими 12 месяцев от проведения операции, но не позднее развития фиброза

1–2 степени, с целью диагностики последнего проводятся регулярные пункционные биопсии печени. Данные сроки обусловлены попыткой свести к минимуму риск отторжения донорского органа и сохранить максимальную эффективность данной схемы терапии благодаря ее инициации на более ранних стадиях фиброза. Инициация терапии ПППД+Р возможна в более ранние сроки, уже через 6 месяцев.

Анализ динамики уровня АЛТ показал, что при терапии препаратами ПППД дольше и чаще (вплоть до завершения терапии) сохранялись повышенные цифры печеночного фермента. Нормализация биохимических показателей крови при лечении ПИ+Р происходила у всех пациентов уже к 4 неделе лечения.

При повторном обследовании отрицательные результаты PCR HCV RNA в сроки 4 недели в случае терапии ПИ+Р не получены ни у одного пациента. На 12 недели лечения ПИ+Р неопределяемая вирусная нагрузка зарегистрирована у 5 пациентов, что составило 29,42 % от общего числа пролеченных, на 24 недели — у 10 (58,82 %). На момент завершения терапии вирусная нагрузка не определялась у 11 (64,71 %) пациентов. Возобновление вирусной репликации в сроки от 4 до 24 недель установлено у 7 пациентов. Таким образом, элиминацию вируса удалось достигнуть лишь у 4 пациентов (23,53 %), что соответствует литературным данным.

При терапии ПППД+Р неопределяемая вирусная нагрузка зарегистрирована у 19 пациентов, не получавших ранее противовирусной терапии, что составило 76 % и у 11 (64,71 %) лечившихся ранее ПИ+Р. Через 4 недели лечения вирус не удалось выявить в крови у пациентов обеих групп. На момент завершения трех месячного курса терапии вирус не определялся у всех пациентов. Лечение прекратили 4 пациента через 3 месяца. Остальные продолжили до 6 месяцев.

При динамическом наблюдении за пациентами, получавшими терапию ПППД+Р, единственными жалобами были жалобы на тошноту, изжогу, иногда рвоту, головную боль. Поскольку они не носили угрожающий характер, регистрировались раньше и корректировались привычными методами, не представлялось возможным связать их исключительно с приемом противовирусных препаратов. Согласно литературным данным и нашему опыту терапия ПИ+Р сопровождалась развитием угрожающих жизни пациентов тромбо-, лейко-, эритропенических состояний, потребовавших неоднократного введения эритропоэтина, тромбопоэтина и/или лейкоэстима. Каждый из пациентов хотя бы один раз получил инъекции указанных препаратов.

Заключение и выводы. ОТП является единственным способом лечения терминальных стадий HCV-инфекции. Однако ее эффективность и переносимость неоднозначна при различных схемах терапии. При использовании интерферон-содержащих схем лечения целесообразно учитывать предикторы эффективности, такие как генотип, полиморфизмом гена ИЛ-28В, вирусную нагрузку, приобретающие особую актуальность при лечении данной категории пациентов. В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Среди пациентов после ОТП преобладали лица с минимальной клинико-биохимической активностью, уровнем вирусной нагрузки более 1000000 ME/ml, 1 генотипом ВГС, неблагоприятным полиморфизмом единичных нуклеотидов rs12979860 и rs12979860 гена ИЛ-28В (СТ/ТТ (rs 12979860) и TG/GG (rs8099917)).

2. Среди пациентов, взятых на терапию после ОТП, преобладали лица с 1–2 степенью фиброза печени, что является оптимальным для достижения противовирусного ответа. Сроки от момента проведения операции до инициации терапии варьировали от 6 месяцев до 3 лет и определялись особенностью естественного течения у каждого конкретного пациента.

3. Неопределяемый уровень вирусной нагрузки пациенты после ОТП достигают при лечении ПППД+Р в более ранние сроки, на 2 неделе лечения, чем пациенты получающие терапию ПИ+Р.

4. Терапия ПППД+Р предпочтительнее у данной категории пациентов, в виду большей эффективности и меньшим количеством нежелательных эффектов.

Литература

1. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide / J. F. Perz [et al.] // *J. Hepatol.* — 2006. — Vol. 45, No. 4. — P. 529–538.

2. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence / K. Mohd Hanafiah [et al.] // *Hepatology.* — 2013. — Vol. 57, No. 4. — P. 1333–1342.

3. Hoyert, D. L. Deaths: preliminary data for 2011 / D. L. Hoyert, J. Xu. // *Natl Vital Stat. Rep.* — 2011. — Vol. 61, No. 6. — P. 1–51.

4. Natural History of Clinically Compensated Hepatitis C Virus—Related Graft Cirrhosis After Liver Transplantation / M. Berenguer [et al.] // *Hepatology.* — 2000. — Vol. 32, No. 4. — P. 852–858.

5. Howell, J. Hepatitis C recurrence: the Achilles heel of liver transplantation / J. Howell, P. Angus, P. Gow // *Transpl. Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 16, No. 1. — P. 1–16.

6. Roche, B. Risk factors for hepatitis C recurrence after liver transplantation / B. Roche, D. Samuel // *J. Viral Hepat.* — 2007. — Vol. 14, suppl. 1. — P. 89–96.

7. Efficacy and safety of peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin in hepatitis C patients with advanced fibrosis and cirrhosis / S. Bruno [et al.] // *Hepatology.* — 2010. — Vol. 51, No. 2. — P. 388–397.

8. Roche, B. Hepatitis C virus treatment pre- and post-liver transplantation / B. Roche, D. Samuel // *Liver Int.* — 2012. — Vol. 32, suppl. 1. — P. 120–128.

9. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance / D. Ge [et al.] // *Nature.* — 2009. — Vol. 461, No. 7262. — P. 399–401.

EXPERIENCE OF ANTI-VIRUS THERAPY OF PATIENTS WITH HCV-INFECTION AFTER ORTHOTOPIC TRANSPLANTATION

E.N. Yagovdik-Teleznaya

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Chronic viral pathology of the liver is an urgent public health problem due to the widespread prevalence, the frequency of injury to young people of working age and the development of severe complications, such as cirrhosis and cancer, leading to death. Among patients after orthotopic liver transplantation (OLT), persons with minimal clinical and biochemical activity, a viral load more than 1000000 ME/ml, 1 HCV genotype, adverse polymorphism of single nucleotides rs12979860 and rs12979860 of the IL-28B gene prevailed. Among patients taken for therapy after OLT, persons with 1–2 degrees of liver fibrosis prevailed, which is optimal for achieving an antiviral response. The time from the operation to the initiation of therapy varied from 6 months to 3 years, and the peculiarity of the natural course in each individual patient was determined. Uncertain level of viral load patients after OLT achieve in the treatment of antivirals of direct action in combination with ribavirin (ADA+R) at an earlier time than patients receiving therapy by pegylated interferons in combination with ribavirin. Therapy of ADA+R is preferable in this category of patients, because of greater efficacy and fewer undesirable effects.

Keywords: hepatitis C virus, chronic infection, orthotopic liver transplantation, virus-associated cirrhosis, antiviral therapy.

Поступила 18.09.2017

PERSISTENT HHV-6, HHV-7 AND PARVOVIRUS B19 INFECTION AS TRIGGER FACTOR OF RHEUMATOID ARTHRITIS AND OSTEOARTHRITIS DEVELOPMENT

M. Murovska¹, A. Kadisa^{1,2}, Z. Nora-Krukle¹, S. Skuja³, V. Groma³, A. Lejniņš²
¹*A.Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology, Riga Stradiņš University, Riga, Latvia;*
²*Riga East Clinical University Hospital, Riga, Latvia;*
³*Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradiņš University, Riga, Latvia*

Summary. We investigated frequency and activity stage of persistent HHV-6, HHV-7 and B19 infection in RA and OA patients and infection association with the diseases clinical activity and aggression. DNA samples from blood of 80 RA, 78 OA patients and 19 healthy controls, from synovial fluid of 6 RA and 34 OA, and synovial tissue of 7 RA and 54 OA patients were analysed for viral genomic sequences using nPCR. Synovial tissues samples were analysed for the viral antigen using immunohistochemistry. We find that B19 infection influences the RA activity and aggressiveness, but active and latent HHV-6 and/or HHV-7 infection increases RA activity and progression in several clinical and laboratory parameters. HHV-6, HHV-7 and B19 infection effect on OA disease activity is low. Presence of HHV-6, HHV-7 and B19 infection markers in local inflammation site allows suggest these viruses as one of the etiopathogenic factors in RA and OA development.

Keywords: HHV-6, HHV-7, parvovirus B19, rheumatoid arthritis, osteoarthritis.

Introduction. Viruses and viral infections are considered to be the main risk factors for autoimmune disease development (especially for individuals with genetic predisposition). The development of several autoimmune pathologies, including multiple sclerosis, autoimmune connective tissue diseases, scleroderma and Hashimoto thyroiditis, are linked to human herpes virus 6A/B (HHV-6A/B) infection [1–4]. It is considered that also human parvovirus B19 (B19) as etiologic or contributory factor is involved in the development of such diseases as rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus, anti-phospholipid syndrome, systemic sclerosis and vasculitis. RA is a chronic autoimmune disorder characterized by symmetrical, destructive polyarthritis and simultaneously by systemic inflammation that has a long-term impact on various organs, vessels and the hematopoietic system. The exact cause of the rheumatoid process is not known yet. Our former research has demonstrated the B19 linkage to RA development and association between viral infection activity and a clinical course of disease [5, 6]. In turn, pathogenesis routes of osteoarthritis (OA) currently viewed as a multifactorial disease affecting the whole joint, triggered initially by an affection of articular cartilage including an intrinsic defect in collagen synthesis, and followed by a combination of cellular changes and biomechanical stress or trauma causing secondary changes distinguish viral infection and autoimmune disease as possible contributing factors [7, 8].

Purpose of the Study. The aim of the study was to investigate frequency and activity stage of persistent HHV-6, HHV-7 and B19 infection in RA and OA patients and to evaluate the association with the diseases clinical and laboratory activity and aggression.

Methods used. 80 RA patients, 78 OA patients and 19 healthy controls were enrolled in the study. DNA samples from whole blood and cell free blood plasma from controls, RA and OA patients as well as synovial fluid from 6 RA and 34 OA and synovial tissue samples from 7 RA and 54 OA patients were analysed for the presence of viral genomic sequences using nPCR and for the viral antigen using immunohistochemistry. HHV-6 and HHV-7 genomic sequences were detected in accordance with Secchiero et al. (1995) and Berneman et al. (1992), respectively [9, 10]. All synovial tissue samples were routinely fixed, embedded, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemistry was performed conventionally using the following primary monoclonal antibodies: anti-HHV-6

(2001) antibody raised against viral lysate and detecting A and B strains (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA, 1:200), anti-HHV-7 (Advanced Biotechnologies, Columbia, MD, gB (7-VE-7), 1:500). B19 genomic sequence was detected by nPCR in accordance with Barah et al. (2001) [11] and immunohistochemical reaction was performed using anti-parvovirus B19 monoclonal antibody raised against VP1/VP2 viral antigens (Leica Biosystems, Novocastra, clone R92F6, 1:20). The amplification of the primary antibody and visualization of reaction products were performed applying the HiDef Detection HRP Polymer system and diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate kit. The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, washed, mounted, and covered with coverslips. Immunohistochemical controls included the omission of the primary antibody. The sections were photographed by a Leitz DMRB bright field microscope using a digital camera DC 300F. The assessment of conventional histopathology and immunostaining was performed by two independent observers. Immunohistochemistry slides were scanned and captured for better evaluation of viral antigen markers along with their spatial distribution by a Glissando Slide Scanner (Objective Imaging Ltd., Cambridge, UK) 0.5µm/pixel resolution with 20x objective, and 0.275µm/pixel resolution with 40x objective.

Essential Results. HHV-6 and/or HHV-7 genomic sequences in whole blood DNA was detected in 67/80 (83.8 %) RA patients, in 63/78 (80.8 %) OA patients and in 15/19 (78.9 %) control individuals. In all positive cases DNA was isolated from cell-free blood plasma and analyzed for the presence of viral genomic sequences. Active HHV-6 infection was detected in 10/67 RA (14.9 %), in 16/63 (25.4 %) OA patients, and in 4/15 (26.7 %) healthy subjects; active HHV-7 infection — in 13/67 (19.4 %) RA, in 14/63 (22.2 %) OA patients, and in 3/15 (20 %) healthy control individuals (table 1).

Table 1. — Frequency of persistent, active and latent HHV-6 and HHV-7 infection in patients with RA and OA as well as in healthy individuals

Infection type Group	Without infection	Persistent viral infection			Active viral infection			Latent infection
		HHV-6	HHV-7	Both	HHV-6	HHV-7	Both	
RA	13/80	6/67	42/67	19/67	8/67	11/67	2/67	46/67
OA	15/78	1/63	41/63	21/63	9/63	7/63	7/63	40/63
Healthy individuals	4/19	0/15	10/15	5/15	3/15	2/15	1/15	9/15

In 22/80 (27.5 %) RA, 11/78 (14.1 %) OA patients and 2/19 (10.5 %) healthy individuals' whole blood DNA B19 genomic sequences were found with significant difference between the RA patients and OA patients as well as control group. In 15/22 RA (68.2 %) and in 6/11 OA (54.5 %) patients viremia was revealed without significant differences between the groups. In RA patients with B19 active infection markers the higher mean indices of disease activity and severity were determined.

HHV-6 and/or HHV-7 genomic sequences were also detected in synovial fluid DNA of 6/6 (100 %) RA and 17/32 (53.1 %) OA patients, and in synovial tissues' DNA of 6/7 RA (85.7 %) and 27/54 (50.0 %) OA patients. HHV-6 and/or HHV-7 genomic sequences were detected in more than 50 % of RA and OA patients' synovial fluid and synovial tissues' DNA samples, but in RA patients' DNA samples they were detected more often than in OA patients synovial fluid and synovial tissue DNA samples (100 % and 85.7 %, and 53.1 % and 50.0 %, respectively) (table 2). In turn B19 genomic sequence was detected in 1/6 RA patients and in 6/32 OA patients synovial fluid DNA samples and in 4/7 RA patients' and in 6/54 OA patients' synovial tissues DNA samples.

Table 2. — Frequency of virus-specific DNA in synovial tissues' and synovial fluid DNA samples of RA and OA patients

Patients Materials Viral sequences	Rheumatoid arthritis patients		Osteoarthritis patients	
	Synovial fluid (n=6)	Synovial tissues (n=7)	Synovial fluid (n=32)	Synovial tissues (n=54)
HHV-6	4	1		3
HHV-7		1	13	19
HHV-6, HHV-7	1		3	3
B19			5	3
HHV-6, B19	1	1		
HHV-7, B19		2	1	1
HHV-6, HHV-7, B19		1		2
Without	0	1	10	23

In RA, synovial membrane when viewed routinely often demonstrated villous and papillary hyperplasia. Synovial lining often was greatly hypertrophied (8–10 cells thick) whereas subintimal area — heavily infiltrated with inflammatory cells, including T and B lymphocytes, macrophages, mast cells, and giant cells (figure 1). The intense cellular infiltrates were surrounded by the congested hyperemic capillaries. Cartilage and bone destruction were a characteristic of RA. In turn, a characteristic evidence of OA revealed in the synovial membrane samples apart of cartilage involvement were either diffuse or/and perivascular fibrosis and inflammatory infiltration often demonstrated in an inflammatory form of OA. HHV-6, HHV-7 and B19 DNA-positive synovial tissues processed for assessment of viral antigens using the immunohistochemistry reactions demonstrated various cellular targets both permissive and non-permissive for the viral factors studied. Both RA and OA enrolled in the given study demonstrated the entire joint constituents affected by the viral antigens. HHV-6 immunopositivity accounted for the lining synoviocytes, the sublining vascular endothelial cells, foam cells and inflammatory infiltrates whereas HHV-7 — for synoviocytes and endothelial cells (figure 2). Expression of B19 viral proteins appeared within synoviocytes including non-permissive fibroblast-like cells, endothelial cells, and macrophages.

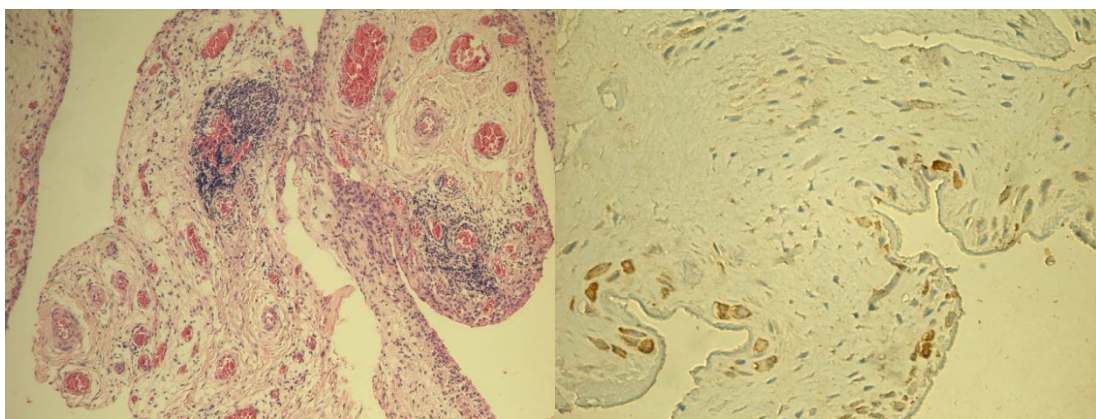


Figure 1, 2. — RA: synovial villous proliferations with some cellular hyperplasia, congested hyperemic capillaries, and chronic inflammatory cells and follicles within the subsynovial tissue; HHV-7-positive cells within synovial lining and sublining; H&E; HHV-7 immunohistochemistry; original magnification x100; x400.

Comparison of the laboratory findings with clinical characteristics of corresponding patients showed that the number of swollen joints is larger in the group of RA patients with active persistent B19 infection suggesting that B19 infection can influence the disease activity.

In RA patients with active B19 infection had high levels of rheumatoid factor (RF), as well as higher overall aggressiveness of the disease, which is determined by the degree of RF and anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) elevation. This indicates the role of B19 infection in the deterioration of RA progression. In addition, 46.7 % of RA patients with active B19 infection were in early stage of RA, indicating a potential role of the virus in RA development. Active HHV-6 and HHV-7 infection has a greater effect on RA activity and less effect on the aggressiveness of the disease. Concomitant reactivation of HHV-6 and HHV-7 may result in a more aggressive RA course. The disease course was also affected by persistent HHV-6 and HHV-7 infection in latent stage as evidenced by prolonged morning stiffness in RA patients, a higher incidence of some serious RA complications (scleritis and cervical spine damage) and a higher level of certain inflammatory events. Presence of HHV-6 and HHV-7 sequences in synovial fluid and synovial cells of affected joints of OA patients shows that these viruses are also involved in OA etiopathogenesis. The different stages of the persistent B19 infection as well as the duration of infection before the patient is included in the study, has a slight effect on the clinical and laboratory progression of OA.

Conclusions. Despite that there was no significant correlation between frequency of persistent single and concurrent HHV-6 and HHV-7 infection, as well as its reactivation and RA clinical course, we find that both active and latent HHV-6 and/or HHV-7 infection increases RA activity and progression in several clinical and laboratory parameters, but the effect of HHV-6 and HHV-7 infection on OA disease activity is low. B19 infection influences the RA activity and aggressiveness but has only a slight effect on the clinical and laboratory progression of OA. Presence of HHV-6, HHV-7 and B19 infection markers in local inflammation site allows suggest these viruses as one of the etiopathogenic factors in RA and OA development.

Acknowledgements. This work was supported by the National Research Program “BIOMEDICINE”.

References

1. Correlation between HHV-6 reactivation and multiple sclerosis disease activity / S. Chapenko [et al.] // *J. Med. Virol.* — 2003. — Vol. 69, No. 1. — P. 111–117.
2. Human herpesvirus 6 and 7 reactivation and disease activity in multiple sclerosis / Z. Nora-Krukle [et al.] // *Medicina (Kaunas).* — 2011. — Vol. 47, No. 10. — P. 527–531.
3. Virologic and immunologic evidence supporting an association between HHV-6 and Hashimoto's thyroiditis / E. Caselli [et al.] // *PLoS Pathog.* — 2012. — Vol. 8, No. 10. — e1002951. — doi: 10.1371/journal.ppat.1002951.
4. Selective reactivation of human herpesvirus 6 in patients with autoimmune connective tissue diseases / F. Broccolo [et al.] // *J. Med. Virol.* — 2013. — Vol. 85, No. 11. — P. 1925–1934.
5. Incidence and clinical significance of parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis / S.V. Kozireva [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2008. — Vol. 35, No. 7. — P. 1265–1270.
6. Use of exploratory factor analysis to ascertain the correlation between the activities of rheumatoid arthritis and infection by human parvovirus B19 / N. Kakurina [et al.] // *Medicina (Kaunas).* — 2015. — Vol. 51, No. 1. — P. 18–24.
7. Detection of parvovirus B19 in synovial fluids of patients with osteoarthritis / B. Aslan [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 60, No. 4. — P. 381–385.
8. Man, G.S. Osteoarthritis pathogenesis — a complex process that involves the entire joint / G.S. Man, G. Mologhianu // *J. Med. Life.* — 2014. — Vol. 7, No. 1. — P. 37–41.
9. Quantitative PCR for human herpesviruses 6 and 7 / P. Secchiero [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 1995. — Vol. 33, No. 8. — P. 2124–2130.

10.cDNA sequencing confirms HTLV-I expression in adult T-cell leukemia/lymphoma and different sequence variations in vivo and in vitro / Z.N. Berneman [et al.] // Leukemia. — 1992. — Vol. 6, suppl. 3. — P. 67S–71S.

11.Association of human parvovirus B19 infection with acute meningoencephalitis / F. Barah [et al.] // Lancet. — 2001. — Vol. 358. — P. 729–730.

ПЕРСИСТИРУЮЩАЯ ИНФЕКЦИЯ ГЕРПЕСВИРУСА ЧЕЛОВЕКА 6, 7 И ПАРВОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА В19 КАК ПУСКОВОЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА И ОСТЕОАРТРИТА

М. Муровска¹, А. Кадыша^{1,2}, З. Нора-Крукле¹, С. Скуя³, В. Грома³, А. Лейниекс²

*¹Институт микробиологии и вирусологии им. А. Кирхенштеина, Рижский университет
им. П. Страдыня, Рига, Латвия;*

²Рижская восточная университетская больница, Рига, Латвия;

³Институт анатомии и антропологии, Рижский университет им. П. Страдыня, Рига, Латвия

Исследованы частота встречаемости и стадия активности персистирующей инфекции герпесвируса человека 6, 7 и парвовируса человека В19 у больных с ревматоидным артритом (РА) и остеоартритом (ОА), а также их взаимосвязь с клинической картиной и агрессивностью заболевания. Образцы ДНК, выделенной из крови 80 больных с РА, 78 с ОА и 19 здоровых контрольных больных, а также синовиальной жидкости 6 больных с РА и 34 больных с ОА, синовиальной мембраны 7 больных с РА и 54 больных с ОА были проанализированы на предмет выделения последовательностей вирусного генома, используя ПЦР с внутренним праймированием. Вирусные антигены в образцах синовиальной ткани были анализированы, используя метод иммунной гистохимии. Выявлено, что В19 инфекция оказывает влияние на активность и агрессивность РА, в свою очередь, активная и латентная инфекции герпесвируса человека 6, 7 усиливают активность РА и вызывают повышение некоторых клинических и лабораторных показателей. Инфекции герпесвируса человека 6, 7 и парвовируса человека В19 оказывают слабое влияние на активность ОА. Выявление маркеров инфекции герпесвируса человека 6, 7 и парвовируса человека В19 в местах локального воспаления свидетельствует об их роли в этиопатогенезе РА и ОА.

Ключевые слова: герпесвирус человека 6, 7, парвовирус человека В19, ревматоидный артрит, остеоартрит.

Поступила 04.10.2017

PRESENCE OF PARVOVIRUS B19 GENOMIC SEQUENCES AND EXPRESSION OF B19 ANTIGENS IN TISSUE FROM POST-MORTEM INDIVIDUALS WITH UNSPECIFIED ENCEPHALOPATHY

A. Vilmane¹, S. Skuja², S. Roga³, S. Rasa¹, Z. Nora-Krukle¹, M. Murovska¹

¹A. Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology, Riga Stradiņš University, Riga, Latvia;

²Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradiņš University, Riga, Latvia;

³Department of Pathology, Riga 1st Hospital, Riga, Latvia

Summary. Human parvovirus B19 (B19) has been associated with different neurological disorders including encephalopathy, although the role of B19 in pathogenesis of this disease is still unclear. In this study we determined the frequency and quantity of B19 genomic sequences in DNA from blood and brain tissue samples from individuals with unspecified encephalopathy (UEP). Expression of B19 antigens in brain tissues was estimated using immunohistochemistry. Performing qualitative and quantitative PCR methods B19 *NS1* and *VP1* gene sequences were detected in 77.27 % cases. B19 antigens were found in endothelial and microglial cells in gray and white matter of the frontal and temporal lobes. The number of B19 positive astrocytes was higher ($p < 0.001$) in gray matter than in white matter of both lobes although more often in frontal lobe ($p < 0.001$). Our conclusion is that B19 is commonly detected in tissue from individuals with UEP and increased number of B19 positive cells has been seen in the gray matter of the cortical frontal and temporal lobes.

Keywords: parvovirus B19, unspecified encephalopathy, brain tissue.

Introduction. Human parvovirus B19 (B19) infection has been associated with a range of neurologic disorders including acute encephalitis, meningoencephalitis, encephalopathy and peripheral neuropathy [1; 2; 3], but it is still not completely understood how this virus affect the brain. Studies correlating viral DNA, RNA, or protein detection in different tissues to a change in the cellular microenvironment or a specific disease state are limited and contradictory [4]. The aim of this study was to determine the frequency and quantity of B19 genomic sequences in DNA from blood and brain tissue samples as well to estimate the expression of B19 antigens in brain tissue of post-mortem individuals with unspecified encephalopathy (UEP).

Methods. In total 22 individuals with UEP were included in this study. Peripheral blood and brain tissue (frontal lobe and temporal lobe) autopsy samples were collected and DNA extracted using phenol-chloroform method. Presence of B19 *NS1* gene sequence in DNA samples was determined using nested polymerase chain reaction (nPCR) according to Barah et al 2001 [2]. Viral load was estimated using commercial real-time PCR (qPCR) kit (Parvovirus B19 Real-TM Quant, Sacace Biotechnologies, Italy) targeting B19 *VP1* gene and results were calculated as copies per microgram of DNA (copies/ μ g DNA). The grey and the white brain matter obtained from temporal and frontal lobes from 13 PCR positive individuals with UEP were sectioned and immunohistochemical (IHC) reaction using anti-parvovirus B19 antibody (Millipore, Bilerica, MA, clone R92F6, 1:70) that recognizes an epitope common to *VP1* and *VP2* structural proteins of B19, and quantitative estimation of immunopositive cells was performed. The expression of antigens was estimated in 10 randomly selected vision fields of each sample at $\times 400$ magnification, using Leica light microscope (LEICA, LEITZ DMRB, Germany) and Glissando Slide Scanner (Objective Imaging Ltd., Cambridge, UK). Reproducible measurements (Aperio ImageScope program v12.2.2.5015) of tissue marker were obtained. Calculations were performed using SPSS 23.0 program. IHC results were presented as median with interquartile range (IQR).

Results. Combining both PCR techniques B19 genomic sequences were detected in 17 out of 22 (77.27 %) individuals with UEP. In three individuals with UEP virus was detected

in all three DNA sample types, in three individuals — in two sample types (brain tissue) and in eight individuals just in one of the sample types (one case in DNA from whole blood, three cases in DNA from frontal lobe and four cases in DNA from temporal lobe) (Figure 1).

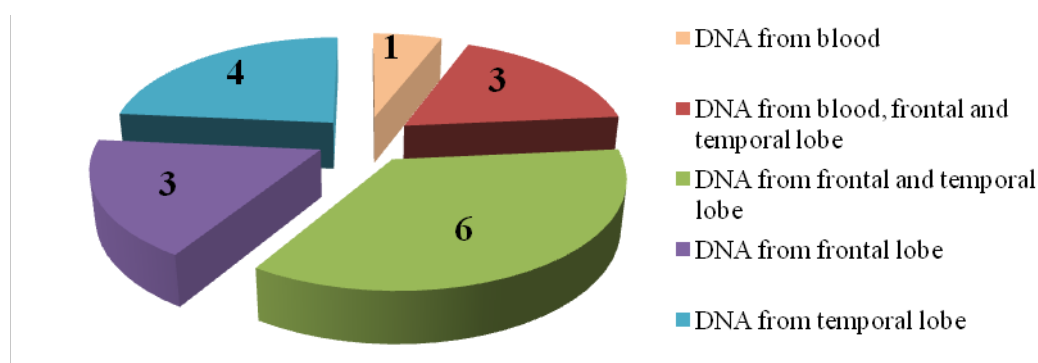


Figure 1. — Presence of B19 *NS1* and *VP1* gene sequences in different tissue DNA samples from individuals with UEP

Using qPCR B19 *VP1* gene sequence was quantified in 15 out of 22 (68.18 %) individuals. Viral load in three out of four nPCR positive whole blood samples was 910.31; 61.77 and in one — 29.74 copies/ μ g DNA respectively. In one out of these four cases, the viral load was below the detection level. Median viral load in frontal lobe tissue samples was 10.56 (from 3.32 to 31.44) copies/ μ g DNA and in temporal lobe tissue samples 23.77 (from 3.59 to 60.94) copies/ μ g DNA. B19 *NS1* gene sequence was detected in 10 out of 22 (45.45 %) individuals with UEP.

We detected a B19 positive endothelial and microglial cells in both gray and white matter of the frontal and temporal lobes. In the frontal lobe, a statistically higher number of B19 positive astrocytes compared to oligodendrocytes was found [in the grey and white matter: 3.00 (2.00; 5.00) and 1.00 (1.00; 3.00); 3.00 (1.00; 4.00) and 2.00 (1.00; 3.00), respectively]. In the grey matter of the temporal lobe, a statistically higher number of B19 positive astrocytes compared to oligodendrocytes was found (3.00 (1.00; 5.00) and 1.00 (0.00; 3.00), respectively). The number of B19 positive astrocytes was higher ($p < 0.001$) in gray matter than in white matter of both frontal and temporal lobes (Figure 2) although more often in frontal lobe ($p < 0.001$).

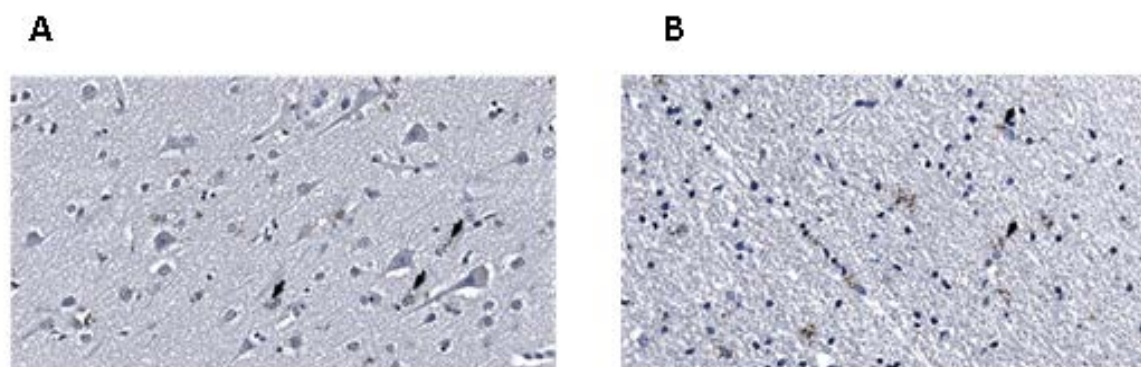


Figure 2. — A - B19 immunopositivity in the astrocytes (black arrow), the grey matter of the frontal lobe, $\times 400$. B - B19 immunopositivity in the astrocytes (black arrow), the white matter of the temporal lobe, $\times 400$

Discussion. Although parvovirus B19 has been associated with wide range of pathologies such as hydrops fetalis, transient aplastic crisis, encephalitis, liver diseases, myocarditis, etc. [1; 5; 6; 7; 8] in many cases the role of B19 infection in these diseases is ambiguous. Previously, the presence of B19 DNA in different tissue types, including brain tissue, has been reported [4; 9; 10; 11; 12]. Hobbs in her study using nPCR method detects B19 persistency in ~14 — 42 % of adult human brain tissue samples including those with neurological disorders [10]. In our study, performing qualitative and quantitative PCR, B19 genomic sequences are detected in 68.18 % of all cases, although nPCR results are 45.45 % B19 positive. It might be explained due to different targeted gene of the used PCR methods.

As mentioned above, pure data about B19 target cells in the brain tissue has been previously reported. Our observations revealed the expression of the B19 protein in the endothelial and activated microglial/macrophage cells of the frontal and temporal lobes. Moreover, in the case of an encephalopathy, the number of positive astrocytes and oligodendrocytes were found. These results were similar to those demonstrated by Schaudien and colleagues, when animal parvoviruses were examined [13]. We found a higher number of B19 positive cells in the gray matter than in the white matter, leading us to believe that the gray matter is more actively threatened in the case of B19 infection. These results seem to be opposite to the findings made by Bonvicini group [14].

Conclusion. B19 genomic sequence is commonly detected in tissue DNA from individuals with UEP. The results obtained indicate that it is important to use a combination of methods instead of one method for the detection of B19 genomic sequences. Under conditions of B19 infection the increased number of B19 positive cells has been seen in the gray matter of the cortical frontal and temporal lobes. In order to clarify the role of B19 in UEP aetiology and pathogenesis, it is necessary to increase the study cohort.

References

1. Watanabe, T. Acute encephalitis and encephalopathy associated with human parvovirus B19 infection in children / T. Watanabe, H. Kawashima // *World J. Clin. Pediatr.* — 2015. — Vol. 4, No. 4. — P. 126–134.
2. Association of human parvovirus B19 infection with acute meningoencephalitis / F. Barah [et al.] // *Lancet.* — 2001. — Vol. 358. — P. 729–730.
3. Mononeuropathy multiplex associated with acute parvovirus B19 infection: characteristics, treatment and outcome / T. Lenglet [et al.] // *J. Neurol.* — 2011. — Vol. 258, No. 7. — P. 1321–1326.
4. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process / L. A. Adamson-Small [et al.] // *Virus Res.* — 2014. — Vol. 190. — P. 8–16.
5. Anderson, L. J. Human parvovirus B19 and pregnancy / L. J. Anderson, E. S. Hurwitz // *Clin. Perinatol.* — 1988. — Vol. 15. — P. 273–286.
6. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sicklecell anaemia / J. R. Pattison [et al.] // *Lancet.* — 1981. — Vol. 1. — P. 664–665.
7. Acute hepatitis as a manifestation of parvovirus B19 infection/ A. Hatakka [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2011. — Vol. 49. — P. 3422–3424.
8. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens / S. Pankuweit [et al.] // *Hum. Pathol.* — 2003. — Vol. 34. — P. 497–503.
9. Human parvovirus B19 infection and hepatitis / S. J. Naides [et al.] // *Lancet.* — 1996. — Vol. 347. — P. 1563–1564.
10. Hobbs, J. A. Detection of adeno-associated virus 2 and parvovirus B19 in the human dorsolateral prefrontal cortex / J. A. Hobbs // *J. Neurovirol.* — 2006. — Vol. 12. — P. 190–199.
11. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus / A. Manning [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 195. — P. 1345–1352.

12. Fetal brain infection with human parvovirus B19 / H. Isumi [et al.] // *Pediatr. Neurol.* — 1999. — Vol. 21. — P. 661–663.

13. Leukoencephalopathy associated with parvovirus infection in Cretan hound puppies / D. Schaudien [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2010. — Vol. 48, No. 9. — P. 3169–3175.

14. Meningoencephalitis with persistent parvovirus B19 infection in an apparently healthy woman / F. Bonvicini [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 47, No. 3. — P. 385–387.

НАЛИЧИЕ ГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ ПАРВОВИРУСА В19 В ПОСТМОРТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ЛИЦ С ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ НЕЯСНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. Вилмане¹, С. Скуя², С. Рога³, С. Раса¹, З. Нора-Крукле¹, М. Муровска¹

¹*Институт микробиологии и вирусологии имени А. Кирхенштейна, Рижский университет им. П. Страдиньша, Рига, Латвия;*

²*Институт анатомии и антропологии, Рижский университет им. П. Страдиньша, Рига, Латвия;*

³*Департамент патологии, 1-я Рижская больница, Рига, Латвия*

Парвовирус человека В19 (В19) ассоциирован с различными неврологическими расстройствами, включая энцефалопатию. Однако до настоящего времени роль вируса В19 в патогенезе этого заболевания до конца не определена. В данном исследовании мы определяли частоту и количество геномных последовательностей в ДНК В19, изолированных из образцов крови и мозговой ткани у лиц с энцефалопатиями (УЕР) неясной этиологии. Экспрессию антигенов В19 в тканях мозга определяли с помощью иммуногистохимии. Используя качественный и количественный методы ПЦР, последовательности В19 *NS1* и *VP1* были обнаружены в 77,27 % случаев. Антигены В19 были обнаружены в эндотелиальных и микроглиальных клетках в сером и белом веществе лобной и височной долях. Число В19–положительных астроцитов было выше ($p < 0,001$) в сером веществе, чем в белом веществе обеих долей мозга, хотя чаще в лобной доле ($p < 0,001$). Нами сделан вывод, что В19 часто обнаруживается в ткани мозга у лиц с УЕР. В сером веществе кортикальных лобных и височных долей наблюдалось увеличение числа В19–положительных клеток.

Ключевые слова: парвовирус В19, энцефалопатия неясной этиологии, ткань головного мозга.

Поступила 27.09.2017

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА НА ИММУНОФЕНОТИП В-КЛЕТОК

Н.Г. Антонец, А.Е. Гончаров, О.В. Бущик, И.В. Романова

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

Резюме. Установлено, что МСК ОБ в условиях сокультивирования *ex vivo* подавляют у В-клеток экспрессию костимуляторной молекулы CD86 и молекул главного комплекса гистосовместимости II типа HLA-DR, при этом, экспрессия молекулы CD80 усиливалась. Выявлено достоверное повышение экспрессии маркера толерогенных свойств — CD85k. Таким образом, МСК ОБ индуцируют у В-клеток иммунофенотип CD86^{lo}CD80^{hi}HLA-DR^{lo}CD85k^{hi}. С учетом предыдущих исследований можно сделать вывод, что МСК ОБ оказывают схожее действие на антиген-представляющие клетки человека как миелоидного, так и лимфоидного происхождения.

Ключевые слова: мезенхимальные стовые клетки, обонятельная выстилка, В-клетки.

Введение. Мезенхимальные стовые клетки обонятельной выстилки человека (МСК ОБ) — относительно недавно описанные тканеспецифичные МСК [1]. Привлекательность МСК ОБ как основы биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) обусловлена атравматичностью забора биоптата ОБ у пациентов [2], простотой культивирования, высокой пролиферативной активностью клеток [3].

В значительной степени терапевтический эффект БМКП обусловлен иммуномодулирующей активностью МСК. Несмотря на то, что влияние мезенхимальных клеток, полученных из различных тканевых источников, на клеточный и гуморальный иммунитет характеризуются рядом общих черт, тканевая локализация обуславливает специфические характеристики МСК. В связи с этим, далеко не всегда возможно экстраполировать данные полученные на одном типе клеток на все группу МСК.

Имунофункциональная активность МСК ОБ изучена в намного меньшей степени в сравнении с широко используемыми МСК костного мозга и жировой ткани. Ранее нами было показано, что МСК ОБ супрессируют митоген-стимулированную пролиферацию Т- и В- клеток, натуральных киллеров [4, 5], индуцируют формирование толерогенного фенотипа и свойств у дендритных клеток [6], противовоспалительного фенотипа у макрофагов [7].

В целом, опубликовано достаточно большое число работ, посвященных оценке влияния МСК на В-клетки. В то же время, влияние именно МСК ОБ на В-лимфоциты практически не изучено, а результаты, полученные различными научными группами, носят противоречивый характер.

Супрессивные свойства в отношении пролиферации В-клеток проявляют МСК различного происхождения, вызывая арест клеточного цикла на стадии G₀/G₁ [8, 9]. Причем антипролиферативный эффект МСК наблюдается в случаях стимулирования В-клеток «сильными» индукторами, например, липополисахаридом (ЛПС). При более «мягкой стимуляции», например, CD40L, не всегда выявляли подавление пролиферации после сокультивирования с МСК.

В сравнительных исследованиях показано, что МСК пупочного канатика оказывают более выраженное ингибирующее влияние на ЛПС-стимулированную пролиферацию В-клеток, в сравнении с МСК костного мозга. Также установлено, что МСК, полученные от пациентов, страдающих системной красной волчанкой, оказывали менее выраженный супрессивный эффект на В-клетки по сравнению с МСК здоровых доноров [10]. Ряд публикаций свидетельствует, что МСК подавляют терминальную дифференцировку, продукцию В-клетками иммуноглобулинов IgM, IgG, IgE, IgA и способность к хемотаксису [8, 11, 12]. В более поздних работах, напротив, указывают на повышение продукции IgM [13].

Результаты последних лет свидетельствуют, что МСК индуцируют дифференцировку регуляторных В-клеток. Усиление продукции V_{reg} противовоспалительного интерлейкина-10 и их непосредственный контакт с Т-клетками может приводить к проявлению иммуносупрессивного эффекта *in vivo* [13–15].

Цель данного исследования — изучить влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека на иммунофенотип В-клеток, что позволит прогнозировать свойства МСК-индуцированных В-клеток.

Материалы и методы. Получение МСК. МСК ОБ получали по известной методике [1]. В исследовании использовали ранее полученные культуры, восстановленные из криоконсервации, которые имели типичную для МСК морфологию и иммунофенотип ($CD90^+CD105^+CD73^+CD31^-CD45^-$).

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК) выполняли на градиенте плотности фиколл-пака ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$). МПК суспендировали в среде RPMI-1640 в концентрации 1×10^6 /мл.

Сокультивирование МСК ОБ и МПК. В экспериментах использовали 5 культур МСК ОБ и 5 образцов МПК, полученные от разных доноров в различных комбинациях. В лунки 6-луночного планшета вносили 2 мл свежей полной питательной среды DMEM/F-12 и добавляли 2 мл взвеси МПК в среде RPMI-1640. Сокультивирование проводили в 3-х вариантах:

- 1) отрицательный контроль (ОК): фосфатный буферный раствор;
- 2) положительный контроль: липополисахарид (ЛПС) *E. coli* в конечной концентрации 1 мкг/мл;
- 3) контактное сокультивирование МСК и МПК: за 2–3 суток до начала совместного культивирования культуры МСК ОБ высевали в 4 мл ростовой среды DMEM/F-12 (1:1) с 10 % FBS (полная ростовая среда) на 6-луночные планшеты в концентрации 15–20 тыс. кл./см². После образования монослоя МСК ОБ с конфлюентностью 70–80 % удаляли из лунки 2 мл ростовой среды и вносили туда 2 мл суспензии МПК в полной ростовой среде RPMI-1640, (соотношение МСК и МПК 1:10–1:20). После внесения всех компонентов планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5 % CO₂ и 95 % влажность воздуха) в течении 3 суток, затем проводили учет результатов.

Определение иммунофенотипа и жизнеспособности. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием моноклональных флуоресцентно-меченных антител к CD19, CD80, CD85k, CD86, CD279, HLA-DR. Жизнеспособность определяли визуализацией зондов Annexin V и To-PRO-3, связывающихся с апоптотическими и некротическими клетками, соответственно. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences, США). Количество исследуемых молекул на поверхности клеток оценивали по показателю относительной интенсивности флуоресценции (RFI). Величину этого параметра выражали в условных единицах флуоресценции.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-й и 75-й перцентилей. Для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Известны два методических подхода в оценке влияния МСК на субпопуляции клеток системы иммунитета *ex vivo*. Первый из них заключается в выделении чистой требуемой фракции лимфоцитов методами иммуномагнитной сепарации или с использованием клеточных сортеров. Такой подход обеспечивает стандартизацию по составу фракции сокультивируемых клеток, что может обеспечить более высокую воспроизводимость результатов. Недостаток метода заключается в том, что из условий эксперимента исключается взаимное влияние различных популяций МПК друг на друга, которое возможно, и которое происходит в процессе сокультивирования. Второй метод, соответственно, предполагает сокультивирование тотальной фракции МПК с МСК и последующим определением исследуемых показателей в разных субпопуляциях клеток. В этом случае сложнее (хотя возможно) стандартизировать соотношение МСК и отдельных популяций, но, в то же, эксперимент в большей степени приближен к естественным условиям организма. Нами был выбран метод сокультивирования МСК ОБ и общей фракции МПК с последующим определением показателей на CD19⁺ В-клетках.

Известно, что МСК оказывают дозозависимый эффект на иммунные клетки. В наших экспериментах сокультивирование МСК и МПК выполняли в диапазоне средних значений 1:10–1:20, что позволило снизить влияние вариабельности содержания В-клеток у разных доноров.

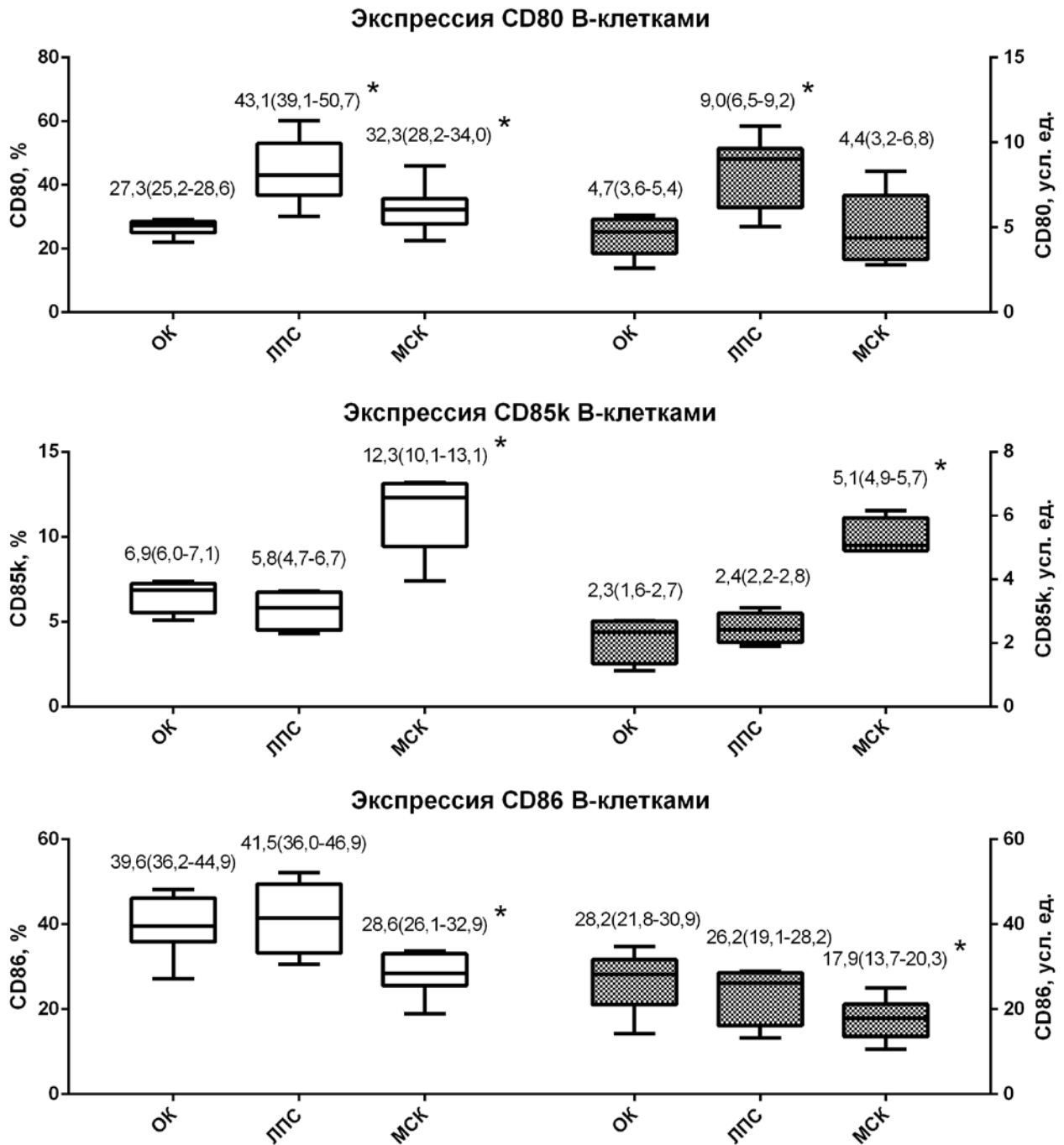
Влияние МСК ОБ на иммунофенотип В-клеток оценивали по экспрессии следующих групп молекул:

1) маркеров иммуногенной активации антигенпрезентирующих клеток: костимуляторных молекул CD80 и CD86, молекул главного комплекса гистосовместимости II типа HLA-DR. По уровню экспрессии этих маркеров можно судить о зрелости клеток и их потенциальной способности к представлению антигена и стимуляции Т-клеток;

2) мембранного рецептора CD85k, который обеспечивает негативную регуляцию интенсивности иммунного ответа через TNFRSF5 и NF-κB сигнальные пути, участвует в формировании толерантности [16];

3) мембранного иммуноглобулина CD279 (PD1 — Programmed cell death 1), который при связывании с коингибиторными молекулами подавляет иммунный ответ, индуцируя апоптоз.

Результаты иммунофенотипического анализа CD19⁺ В-клеток общей фракции МПК, культивированных в различных условиях показаны на рисунке.



* — достоверные различия в сравнении с ОК

Рисунок — Экспрессия молекул CD80, CD85k и CD86 В-клетками

В качестве положительного контроля для подтверждения способности В-клеток к активации использовали ЛПС *E. coli*. Под влиянием ЛПС достоверно увеличивалось содержание CD80⁺ В-клеток ($p=0,002$), усиливалась интенсивность экспрессии молекулы CD80 в 2 раза ($p=0,008$), а также интенсивность экспрессии HLA-DR в 1,7 раз (ОК — 426,7(316,1–505,2), ЛПС — 706,2(625,3–896,0), $p=0,006$), что свидетельствует о активации клеток. ЛПС не оказывал статистически достоверного влияния на уровень экспрессии молекул CD85k, CD86 и CD279.

Установлено, что после сокультивирования с МСК ОБ у В-клеток статистически достоверно снижается экспрессия молекулы CD86 (как процент экспрессии — $p=0,003$,

так и интенсивность экспрессии — $p=0,011$). В то же время, эффект на костимуляторную молекулу CD80 был противоположным — выявлено увеличение числа позитивных клеток в популяции ($p=0,029$), при этом интенсивность экспрессии достоверно не изменилась ($p=0,76$).

Сокультивирование МСК с В-клетками приводило к статистически достоверному снижению экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-DR в 1,8 раза (ОК — 426,7(316,1–505,2), МСК ОВ — 237,7(189,7–264,6), $p=0,005$).

МСК ОВ индуцировали увеличение содержания В-клеток, экспрессирующих маркер толерогенности CD85k ($p=0,014$), и усиление экспрессии этой молекулы ($p=0,03$) на клеточной поверхности.

В противоположность полученным результатам, группой Corcione и соавт. в 2006 г. [8] было показано, что МСК костного мозга не влияют на экспрессию CD80, CD86. В этой связи можно сделать вывод, что МСК ОВ оказывают более выраженный эффект на экспрессию костимуляторных молекул у В-клеток, чем МСК костного мозга.

Ранее нами было установлено схожее влияние МСК ОВ на другие антигенпрезентирующие клетки. Показано, что МСК ОВ индуцируют толерогенный фенотип моноцитарных дендритных клеток $CD86^{lo}CD80^{hi}HLA-DR^{lo}CD273^{hi}CD85k^{hi}$ и стимулируют дифференцировку моноцитов в M2-подобные макрофаги с противовоспалительным фенотипом $CD86^{lo}CD16^{lo}CD64^{lo}CD80^{+}HLA-DR^{lo}CD273^{+}CD284^{hi}$ [6, 7].

Также был проведен анализ жизнеспособности В-клеток в различных условиях сокультивирования. Не выявлено достоверных различий в количестве некротических и апоптотических клеток (не выше 7,5 % в сумме) в популяции В-клеток во всех трех вариантах культивирования. Эти данные свидетельствуют о том, что при ингибирующем влиянии на маркеры иммуногенной активации МСК ОВ не вызывают гибель В-клеток. Кроме того, в наших экспериментах не было выявлено влияния МСК ОВ на экспрессию CD279 ($p>0,7$).

Выводы:

МСК ОВ в условиях сокультивирования подавляют у В-клеток экспрессию костимуляторной молекулы CD86 в 1,4 раза и в 1,6 раз снижают число $CD86^{+}$ клеток. Также выявлено снижение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II типа HLA-DR в 1,8 раза. В то же время, число $CD80^{+}$ В-клеток увеличивалось в 1,2 раза. МСК ОВ стимулировали экспрессию толерогенного маркера CD85k в 2,2 раза при одновременном увеличении числа $CD85k^{+}$ клеток. Таким образом, МСК ОВ индуцируют у В-клеток фенотип $CD86^{lo}CD80^{hi}HLA-DR^{lo}CD85k^{hi}$. При этом МСК ОВ оказывали влияния на жизнеспособность В-клеток.

На этом основании, с учетом ранее полученных результатов [6, 7] можно сделать вывод, что МСК ОВ в условиях сокультивирования *in vitro* оказывают схожее действие на антиген-представляющие клетки как миелоидного, так и лимфоидного происхождения (В-клетки, макрофаги, моноцитарные дендритные клетки), что проявляется в снижении (но не полном подавлении) экспрессии маркера иммуногенной активации HLA-DR и костимуляторной молекулы CD86, при одновременном увеличении в популяции числа клеток, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD80.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов клеточной терапии заболеваний, ассоциированных с избыточным иммунным ответом с вовлечением в иммунопатогенез В-клеток.

Литература

1. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties / B. Delorme [et al.] // *Stem Cells Dev.* — 2010. — Vol. 19, № 6. — P. 853–866.
2. New Techniques for Biopsy and Culture of Human Olfactory Epithelial Neurons / F. Féron [et al.] // *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 1998. — Vol. 124, № 8. — P. 861–866.
3. Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки носовой полости человека / Н.Г. Антоневиц [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* — 2015. — № 1. — С. 42–49.
4. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues / M. Di Trapani [et al.] // *Stem Cells Dev.* — 2013. — Vol. 22, № 22. — P. 2990–3002.
5. Антоневиц, Н.Г. Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека / Н.Г. Антоневиц, А.Е. Гончаров, В.Л. Чекан // *Здравоохранение.* — 2014. — № 10. — С. 14–19.
6. Гончаров, А.Е. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки на антигенный профиль дендритных клеток / А.Е. Гончаров, Н.Г. Антоневиц, В.Л. Чекан // *Новости медико-биологических наук.* — 2015. — Т. 10, № 3. — С. 102–106.
7. Антоневиц, Н.Г. Влияние мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки человека на дифференцировку макрофагов *ex vivo* / Н.Г. Антоневиц, А.Е. Гончаров // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Вып. 9 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова.* — Электрон. текстовые дан. — Минск: ГУ РНМБ, 2016. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). — С. 185–190.
8. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / A. Corcione [et al.] // *Blood.* — 2006. — Vol. 107, № 1. — P. 367–372.
9. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes / S. Tabera [et al.] // *Haematologica.* — 2008. — Vol. 93, № 9. — P. 1301–1309.
10. Collins, E.L. Effect on B cell function by mesenchymal stem cells of different derivation / E.L. Collins, M. Qi, G. Gilkeson // *J. Stem Cell Res. Ther.* — 2015. — Vol. 5, № 7. — P. 294–298.
11. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation / T. H. Shin [et al.] // *Oncotarget.* — 2017. — Vol. 8, № 1. — P. 512–522.
12. Mesenchymal stem cells suppress B cell terminal differentiation / S. Asari [et al.] // *Exp. Hematol.* — 2009. — Vol. 37, № 5. — P. 604–615.
13. Induction of regulatory B-cells by mesenchymal stem cells is affected by SDF-1 α -CXCR7 / Y. Qin [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* — 2015. — Vol. 37, № 1. — P. 117–130.
14. Human mesenchymal stem cells upregulate CD1dCD5(+) regulatory B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis / Y. Guo [et al.] // *Neuroimmunomodulation.* — 2013. — Vol. 20, № 5. — P. 294–303.
15. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via CD5+ B regulatory cells / K. Chao [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* — 2016. — Vol. 7. — P. 109.
16. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors / X. Kang [et al.] // *Cell Cycle.* — 2016. — Vol. 15, № 1. — P. 25–40.

THE INFLUENCE OF THE OLFACTORY MUCOSA-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE B-CELLS IMMUNOPHENOTYPE

N.H. Antonevich, A.Y. Hancharou, O.V. Buschik, I.U. Ramanava

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

It was shown that human olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells (hOM-MSCs) suppressed the expression of the costimulatory molecule CD86 and MHC class II molecules HLA-DR on B-cell surface, at the same time the expression of the CD80 was

slightly enhanced. The expression of tolerogenic marker CD85k was increased after cocultivation. Thus, hOM-MSCs induce B-cell immunophenotype CD86^{lo}CD80^{hi}HLA-DR^{lo}CD85k^{hi}. Taking into account the previously obtained data, it can be concluded that hOM-MSCs possess a similar effect on antigen-presenting human cells of both myeloid and lymphoid origin.

Keywords: mesenchymal stem cells, olfactory mucosa, B-cells.

Поступила 04.09.2017

СУБПОПУЛЯЦИИ ЭФФЕКТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОАРТРИТОМ КОЛЕННЫХ СУСТАВОВ

А.Е. Гончаров¹, Е.В. Дуж¹, И.В. Романова¹, О.В. Дегтерева²,

*¹ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь;*

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

Резюме. Установлено, что у пациентов с остеоартритом (ОА) коленных суставов удельное содержание различных субпопуляций эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти в периферической крови (ПК) и синовиальной жидкости (СЖ) существенно отличалось, с выраженным преобладанием эффекторных Т-клеток в СЖ над другими субпопуляциями Т-лимфоцитов. Выявлены многочисленные положительные и отрицательные корреляционные взаимосвязи между содержанием наивных, TCM-, TEM- и TEMRA-лимфоцитов в СЖ и ПК, а также корреляции между количеством CD4⁺ TEM клеток в СЖ, CD4⁺ TEM, CD4⁺ TEMRA и IRC лимфоцитов крови и активностью заболевания. Установленные закономерности указывают на наличие иммунного компонента, опосредующего воспалительную реакцию при ОА, что отражается на иммунофенотипическом профиле как СЖ, так и ПК, и предполагает возможность использовать данные показатели на практике в диагностических целях.

Ключевые слова: остеоартрит, Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки, проточная цитометрия.

Введение. Остеоартрит (ОА) — это хроническое дегенеративно-дистрофическое заболевание суставного хряща с сопутствующим воспалением синовиальной оболочки и развитием, в последующем, деструктивных изменений субхондральной кости.

В последние десятилетия наблюдается существенный рост заболеваемости ОА, при этом болезнь «молодеет», и все чаще среди пациентов врача-ревматолога можно встретить людей в возрасте до 30 лет. Заболевание наиболее часто поражает коленные суставы, при этом у 25 % пациентов с гонартрозом развивается со временем выраженная инвалидизация [1].

В настоящее время показано, что ОА — заболевание, в патогенезе которого играют важнейшую роль (ауто)иммунные механизмы [1–2]. Предполагается, что степень воспалительной реакции при ОА может коррелировать с изменениями в субпопуляционном составе эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти как в синовиальной жидкости (СЖ), так и в периферической крови (ПК).

Цель исследования — изучить содержание субпопуляций Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток в СЖ и ПК пациентов, страдающих ОА коленных суставов, и определить их ассоциацию с активностью болезни.

Материалы и методы исследований. Объектами для *in vitro* исследований служили образцы СЖ и ПК 19 пациентов с ОА коленных суставов (M17 по МКБ-10). Медианный возраст пациентов составил 68,0 (60,0–71,0) лет. В качестве контрольных значений использовали показатели, ранее полученные при исследовании образцов ПК 23 здоровых добровольцев.

Забор СЖ выполняли во время диагностической пункции пораженного сустава (суставов) и помещали образец в пробирку объемом 50 мл, содержащую 100 мкл раствора гепарина. СЖ подвергали фильтрации через 70 мкм фильтры для удаления конгломератов клеток и фрагментов синовиальной оболочки, затем осаждали клетки центрифугированием. Исследуемый образец клеток СЖ инкубировали с моноклональными антителами на протяжении 15 минут при температуре 4°C. Затем отмывали клетки и учитывали на проточном цитометре BD «FACSCalibur» с последующим анализом в программе «FACSDiva» версии 7 [3]. Образцы ПК готовили для фенотипирования стандартно [4]. Использовали следующие панели антител для клеток крови: 1) CD45RB (FITC, клон MEM-55), CD62L (PE, клон LT-TD180), CD4 (PerCP, клон MEM-241), CD45RA (APC, клон T6D11); 2) CD4 (FITC, клон MEM-241), CD25 (PE, клон MEM-181), CD127 (PE-Cy7, клон HIL-7R-M21); 3) CD3 (FITC, клон UCNT1), HLA-DR (PE-Cy7, клон L243), CD45 (APC, клон J33); для клеток синовиальной жидкости: 4) CD8 (FITC, клон MEM-31), CD62L (PE, клон LT-TD180), CD4 (PerCP, клон MEM-241), CD45RA (APC, клон T6D11).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Statistica» версии 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна-Уитни. Значимыми считали корреляционные связи с коэффициентом ранговой корреляции Спирмена R выше 0,5 [5].

Результаты.

Субпопуляционный состав Т-клеток ПК. Жизненный цикл Т-клеток состоит из нескольких важнейших этапов, в течение которых наивная Т-клетка дифференцируется в Т-клетки памяти и эффекторные Т-лимфоциты, непосредственно принимающие участие в поддержании иммунного воспаления. Данные процессы находят свое отражение в экспрессии ряда важнейших маркеров на клеточной поверхности, в частности, хемокинового рецептора CCR7 (CD197) и L-селектина (CD62L), ассоциированных с миграцией клеток во вторичные лимфоидные органы, костимуляторных молекул CD27 и CD28, проапоптотической молекулы PD1 (CD279) и др. Общепринятая схема дифференцировки клеток вкратце может быть представлена следующим образом: наивные Т-клетки ($CCR7^+/CD62L^+ CD45RA^+CD45R0^-$) → центральные Т-клетки памяти TCM ($CCR7^+/CD62L^+CD45RA^-CD45R0^+CD27^+CD28^+PD1^-$) → эффекторные Т-клетки памяти — TEM (претерминально-дифференцированные: $CCR7^-/CD62L^-CD45RA^-CD45R0^+CD27^{+/-}CD28^{+/-}$) → терминально-дифференцированные Т-клетки — TEMRA ($CCR7^-/CD62L^- CD45RA^+CD45R0^-CD28^-PD1^+$) [6–8]. Помимо этого, представляет интерес минорная субпопуляция лимфоцитов, так называемые, Т-клетки, ассоциированные с воспалением (inflammation-related cells (IRC), имеющие нетипичный «смешанный» иммунофенотип $CD4^+CD45RB^+CD45RA^+CD62L^-$ [9].

Результаты оценки субпопуляций Т-клеток у пациентов с ОА в сравнении с показателями здоровых добровольцев представлены в таблице 1.

Известно, что нормальное протекание воспалительного процесса предполагает уменьшение содержания наивных Т-клеток в ПК и увеличение числа TCM-клеток и, особенно, эффекторных Т-клеток памяти.

Показано, что абсолютное и относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺ TEMRA Т-клеток было значительно увеличено у пациентов с ОА в сравнении с группой здоровых добровольцев. При этом содержание других субпопуляций Т-клеток достоверно не менялось ($p > 0,05$).

Содержание IRC в ПК пациентов с ОА было существенно (в 3 раза) увеличено по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p < 0,05$), что, по всей видимости, отражает наличие иммунного воспаления (синовиит у всех пациентов). Следует отметить, что в группе пациентов с ОА содержание IRC выше 0,5 % отмечено у 14 лиц из 19 (73,9±10,1 %).

Таблица 1 — Содержание субпопуляций Т-клеток периферической крови пациентов с ОА

Субпопуляция лимфоцитов	Здоровые добровольцы (n=23)	Пациенты с ОА (n=19)	P (U-test)
CD4 ⁺ TCM, %	12,8(11,0–17,7)	15,2(12,2–20,9)	0,129
CD4 ⁺ TCM, ×10 ⁶ /мл	0,226(0,184–0,535)	0,380(0,213–0,468)	0,337
CD4 ⁺ Naïve, %	6,8(4,7–10,4)	7,8(4,4–13,7)	0,308
CD4 ⁺ Naïve, ×10 ⁶ /мл	0,152(0,073–0,230)	0,168(0,097–0,260)	0,522
CD4 ⁺ TEM, %	9,3(6,7–12,9)	9,4(6,9–17,0)	0,379
CD4 ⁺ TEM, ×10 ⁶ /мл	0,212(0,137–0,297)	0,243(0,120–0,328)	0,689
CD4 ⁺ TEMRA, %	0,80(0,13–1,39)	1,8(0,4–4,9)	0,031
CD4 ⁺ TEMRA, ×10 ⁶ /мл	0,013(0,002–0,042)	0,056(0,012–0,078)	0,018
CD8 ⁺ TCM, %	5,3(4,2–7,4)	5,9(4,6–8,0)	0,484
CD8 ⁺ TCM, ×10 ⁶ /мл	0,125(0,088–0,163)	0,123(0,095–0,166)	0,842
CD8 ⁺ Naïve, %	13,5(10,9–17,1)	15,9(13,0–23,9)	0,129
CD8 ⁺ Naïve, ×10 ⁶ /мл	0,310(0,222–0,377)	0,302(0,234–0,539)	0,436
CD8 ⁺ TEM, %	7,4(5,9–10,4)	8,2(7,5–10,0)	0,337
CD8 ⁺ TEM, ×10 ⁶ /мл	0,199(0,091–0,281)	0,180(0,136–0,257)	0,734
CD8 ⁺ TEMRA, %	7,6(3,4–14,6)	28,2(17,0–36,4)	0,000001
CD8 ⁺ TEMRA, ×10 ⁶ /мл	0,158(0,084–0,311)	0,557(0,363–0,879)	0,000001
Т-рег. клетки, %	2,97(2,16–4,09)	2,8(2,2–4)	0,883
Т-рег. клетки, 10 ⁶ /мл	0,051(0,039–0,096)	0,056(0,035–0,103)	0,567
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	5,41(3,87–7,17)	7,0(5,7–10)	0,017
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , ×10 ⁶ /мл	0,136(0,075–0,183)	0,149(0,100–0,219)	0,146
IRC, %	0,38(0,24–0,75)	1,2(0,3–4,0)	0,046
IRC, ×10 ⁶ /мл	0,006(0,002–0,009)	0,021(0,011–0,08)	0,023

Удельный вес исследованных субпопуляций среди Т-клеток ПК. Показано, что CD4⁺ клетки ПК были представлены приблизительно в равных долях наивными Т-клетками и TCM-клетками памяти (по 20–25 %), эффекторными клетками памяти (почти 50 %) (рисунок 1). В то же время, терминально-дифференцированные эффекторные клетки составляли всего 5 % от общего числа CD4⁺ Т-лимфоцитов. В противоположность, среди CD8⁺ цитотоксических Т-клеток порядка 50 % составляла TEMRA-субпопуляция, а на долю TEM-клеток приходилось еще 10 %.

Субпопуляционный состав Т-клеток СЖ. Нами показано, что субпопуляционный состав Т-клеток в СЖ существенно отличается от такового в ПК. Как CD4⁺, так и CD8⁺ лимфоциты СЖ были представлены в основном (на 60–80 %) TEM-клетками. В этой связи, наиболее вероятна миграция лимфоцитов в сустав с последующей

дифференцировкой в эффекторные субтипы Т-клеток, поддерживающие иммунное воспаление. Полученные данные указывают на то, что соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов в СЖ при ОА соответствуют «воспалительному» иммунофенотипическому профилю.

Следует отметить, что возможность сравнить полученные данные с группой здоровых добровольцев принципиально отсутствовала в связи с тем, что в непораженном суставе количество СЖ крайне невелико, а клеточность образца минимальна.

Корреляционные взаимосвязи. Выявлено 2 значимые отрицательные корреляционных взаимосвязи средней силы между возрастом и относительным содержанием лимфоцитов крови ($R = -0,517$, $p = 0,023$) и между возрастом и абсолютным содержанием $CD8^+$ ТЕМ клеток периферической крови ($R = -0,616$, $p = 0,005$).

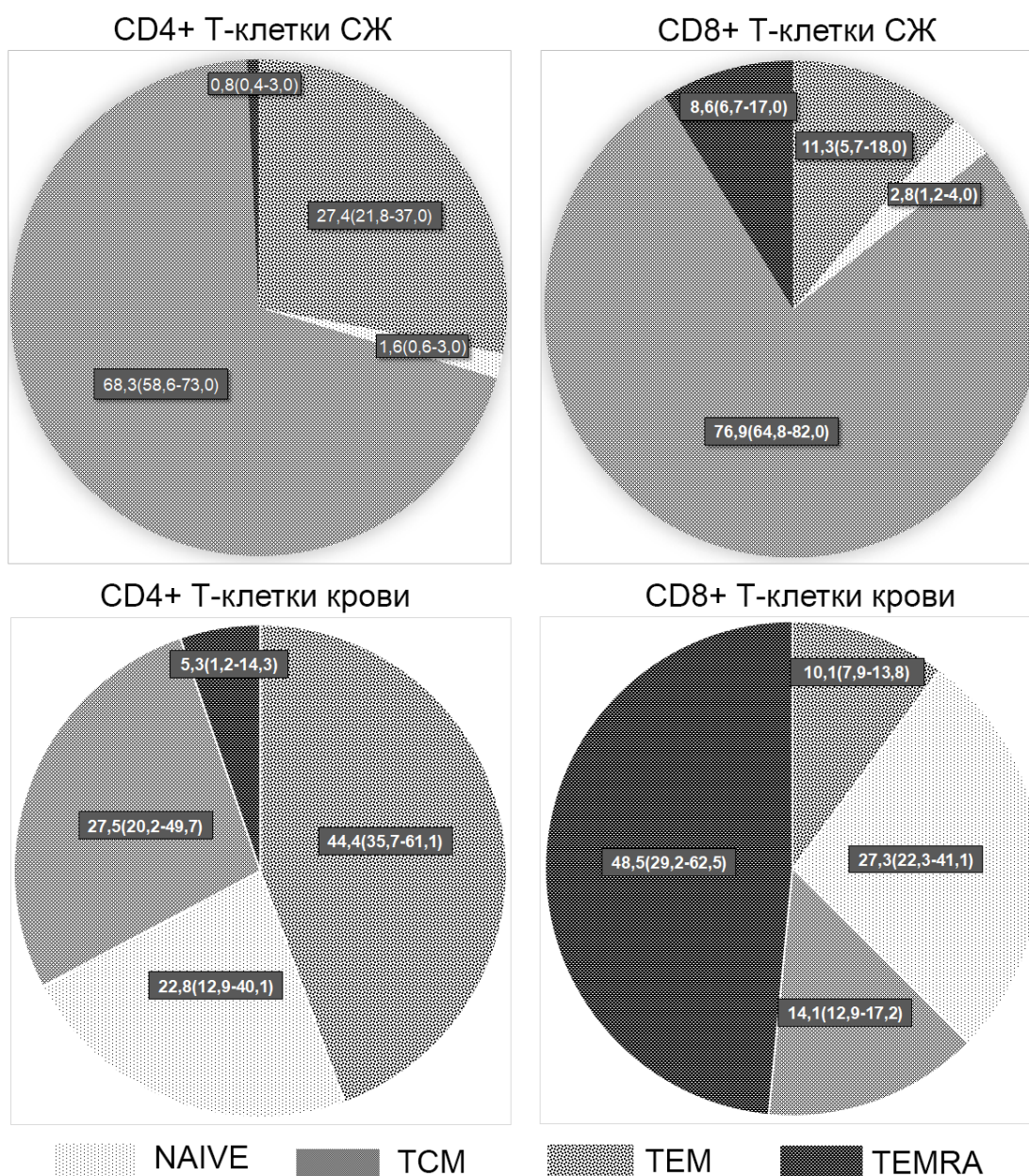


Рисунок 1. — Субпопуляции Т-клеток СЖ и ПК у пациентов с ОА

Небольшое число взаимосвязей показатели иммунитета и возраста можно объяснить прежде всего однородностью группы пациентов. Так, основную часть пациентов (16 из 19) составляли лица пожилого и старческого возраста с медианой 68,0 (60,0–71,0) лет. Следует подчеркнуть, что однородность группы и минимальное число корреляций исследуемых показателей с возрастом положительно сказывается на достоверности получаемых результатов.

Зависимостей исследуемых показателей с содержанием лейкоцитов крови не выявлено. Установлены коррелятивные взаимосвязи между содержанием лимфоцитов крови и абсолютным содержанием множества субпопуляций Т-клеток крови (активированные и регуляторные Т-клетки, CD4⁺ и CD8⁺ ТСМ/ТЕМ субсеты и др.).

Также показана взаимосвязь между содержанием ТЕМ/ТЕМРА и ТСМ/Naïve Т-клеток СЖ. Данные коррелятивные взаимосвязи отражают преимущественно процессы дифференцировки субпопуляций Т-клеток (Naïve->ТСМ->ТЕМ->ТЕМРА) и относительно малоинформативны.

Для иммунолога особый научный интерес представляет изучение и сопоставление изменений в субпопуляционном составе лейкоцитов ПК и экспрессии ими функционально значимых молекул с таковыми изменениями в пораженном органе или ткани. В связи с простотой в техническом плане взятия образца СЖ, ОА — благодарный объект для исследований.

Нами выявлена позитивная корреляция между относительным содержанием различных субпопуляций лимфоцитов крови и СЖ (таблица 2).

Таблица 2. — Корреляционные взаимосвязи между субпопуляциями Т-клеток СЖ и ПК у пациентов с ОА

<i>Субпопуляция Т-клеток СЖ</i>	<i>Субпопуляция Т-клеток ПК</i>	<i>Коэффициент корреляции (R)</i>	<i>Достоверностью различий (p)</i>
CD8 ⁺ ТСМ	CD8 ⁺ Naïve	0,532	0,019
CD8 ⁺ ТЕМРА	CD8 ⁺ ТЕМРА	0,599	0,007
CD4 ⁺ ТЕМ	IRC	0,685	0,001
CD4 ⁺ ТЕМ	CD4 ⁺ ТЕМРА	0,720	0,001
CD4 ⁺ ТЕМ	CD8 ⁺ ТСМ	0,508	0,026
CD4 ⁺ ТСМ	IRC	-0,659	0,002
CD4 ⁺ ТСМ	CD4 ⁺ ТЕМРА	-0,683	0,001
CD8 ⁺ ТЕМРА	CD4 ⁺ ТСМ	-0,584	0,009
CD8 ⁺ ТЕМРА	CD4 ⁺ Naïve	-0,711	0,001

Показана корреляция между активностью заболевания и процентным содержанием CD4⁺ ТЕМ клеток в СЖ, CD4⁺ ТЕМ, CD4⁺ ТЕМРА клеток крови и IRC (рисунок 2).

Заключение.

В проведенном исследовании установлены следующие основные закономерности:

— показано, что у пациентов с ОА доли различных субпопуляций наивных Т-клеток и Т-клеток памяти среди Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в ПК и СЖ существенно отличались, с выраженным преобладанием эффекторных Т-клеток в СЖ над другими субсетами Т-лимфоцитов;

— выявлены многочисленные положительные и отрицательные корреляционные взаимосвязи между содержанием наивных, TCM-, TEM- и TEMRA-лимфоцитов СЖ и ПК;

— установлено, что содержание ассоциированных с воспалением IRC Т-лимфоцитов в ПК у пациентов с ОА статистически достоверно превышало таковое в группе сравнения, при этом, увеличение показателя выше 0,5 % выявлено у 73 % пациентов с ОА;

— установлена корреляция между содержанием $CD4^+$ TEM клеток в СЖ, $CD4^+$ TEM, $CD4^+$ TEMRA и IRC клеток крови и степенью активности заболевания.

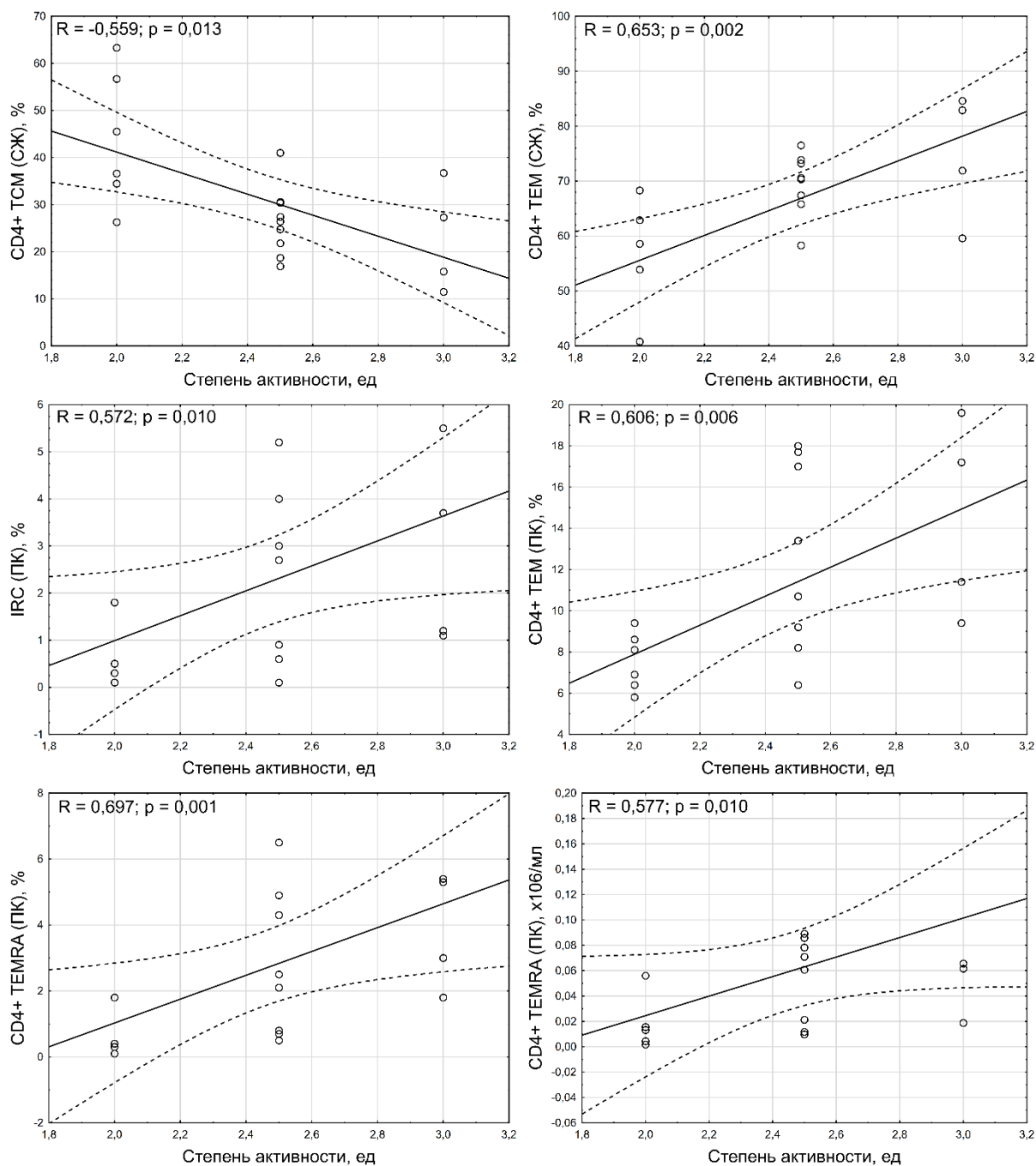


Рисунок 2. — Корреляционные взаимосвязи между активностью ОА и содержанием субпопуляций Т-клеток СЖ и ПК

Таким образом, установленные закономерности указывают на наличие иммунного компонента в воспалительной реакции при ОА. Помимо этого, наличие корреляционных взаимосвязей между показателями ПК и СЖ указывает на то, что локальное иммунное воспаление в пораженном суставе отражается на иммунофенотипической картине крови.

На наш взгляд, определение содержания ряда субпопуляций Т-клеток в ПК (CD4⁺ IRC, TEMRA, TEM) является перспективным направлением для определения степени активности ОА по отдельности, либо в комплексе с другими лабораторными показателями.

Литература

1. Gandek, B. Validity and responsiveness of the knee injury and osteoarthritis outcome score: a comparative study among total knee replacement patients / B. Gandek, J. E. Ware Jr. / *Arth. Care Res.* — 2017. — Vol. 69. — P. 817–825.
2. Kalaitzoglou, E. Innate immune responses and osteoarthritis / E. Kalaitzoglou, T. M. Griffin, M. B. Humphrey // *Curr. Rheumatol. Rep.* — 2017. — Vol. 19, No. 8. — P. 45.
3. BD FACSDiva™ Software [Electronic resource]. — Mode of access : <http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/software/flow-cytometry-acquisition/bd-facsdiva-software/m/111112/overview>. — Date of access : 01.09.2017.
4. Дендритные клетки, моноциты и миелоидные супрессорные клетки периферической крови пациентов с острой ВЭБ-инфекцией / А. Е. Гончаров [и др.] // *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* — 2016. — № 2. — С. 61–69.
5. Spokoiny, V. *Basics of Modern Mathematical Statistics* / V. Spokoiny, T. Dickhaus. — Berlin: Springer, 2015. — 296 p.
6. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study / M. Streitz [et al.] // *Transplant. Res.* — 2013 — Vol. 2, No. 1. — P. 17. — doi: 10.1186/2047-1440-2-17.
7. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence / S. N. Mueller [et al.] // *Annu. Rev. Immunol.* — 2013. — Vol. 31. — P. 137–161.
8. Larbi, A. From “truly naive” to “exhausted senescent” T cells: when markers predict functionality / A. Larbi, T. Fulop // *Cytometry A.* — 2014. — Vol. 85, No. 1. — P. 25–35.
9. T cell subsets: an immunological biomarker to predict progression to clinical arthritis in ACPA-positive individuals / L. Hunt [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2016. — Vol. 75. — P. 1884–1889.

SUBSETS OF EFFECTOR AND MEMORY T-CELLS IN THE SYNOVIAL FLUID AND PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH THE KNEE JOINT OSTEOARTHRITIS

A.Y. Hancharou¹, A.U. Duzh¹, I.U. Ramanava¹, O.V. Degtereva²

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus;

²Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

The prevalence of effector TEM-cells among CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in the synovial fluid (SF) of patients with the OA was shown. Multiple correlations between naïve, TCM-, TEM- and TEMRA-subsets of blood and SF T-cells were established, reflecting the immune inflammation in the affected joint and suggesting the use of the memory/effector T-cell count in the diagnostics of the activity of the OA.

Keywords: osteoarthritis, synovial fluid, T-cells, memory T-cells, effector T-cells

Поступила 07.09.2017

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ И ПОВТОРЯЕМОСТЬ ПРИ ГЕЙТИРОВАНИИ БАЗОФИЛОВ РАЗНЫМИ СПОСОБАМИ

А.Е. Гончаров, И.В. Романова

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

Резюме. Проведена оценка повторяемости и воспроизводимости двух способов гейтирования базофилов IgE^{hi} и CD123⁺HLA-DR⁻. Показано, что оба способа обладали достаточной воспроизводимостью. Повторяемость двух подходов гейтирования полностью соответствовала критериям учета проточной цитометрии. Таким образом, показано, что оба способа гейтирования позволяют получать достоверные результаты при идентификации базофилов.

Ключевые слова: воспроизводимость, повторяемость, гейтирование.

Введение. Существует несколько способов гейтирования базофилов, которые позволяют с той или иной эффективностью идентифицировать базофилы на проточном цитометре. Ранее нами было показано, что наиболее подходящими для идентификации базофилов являются IgE^{hi} и CD123^{hi}/HLA-DR^{neg} [1]. Эффективное гейтирование базофилов является крайне важным для постановки теста активации базофилов (ТАБ), которое проводится с целью диагностики IgE-опосредованной гиперчувствительности. Однако, учитывая, что метод будет использоваться в рутинной практике клинико-диагностических лабораторий, необходимо также оценить повторяемость и воспроизводимость выбранного способа гейтирования.

Целью данного исследования являлась оценка двух наиболее эффективных методов гейтирования IgE^{hi} и CD123⁺HLA-DR⁻ по параметрам воспроизводимости и повторяемости.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования служили 10 образцов периферической крови здоровых добровольцев (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Забор крови производили натошак из кубитальной вены в количестве 5–6 мл в пробирку с гепарином. Кровь в количестве 10 мкл инкубировали с моноклональными антителами CD123 — PE, клон SSDCLY107D2 (Beckman Coulter, США), HLA-DR — PE-Cy 7, клон Immu-357 (Beckman Coulter, США) и IgE — PE, клон 4H10 (ExBio, Чехия) 15 минут в темноте при 4°C. Для лизирования эритроцитов использовали раствор хлорида аммония (3 мл), с которым инкубировали кровь на протяжении 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки осаждали при помощи центрифуги, сливали супернатант и добавляли 300 мкл буферного раствора. Учет проб проводили на проточных цитометрах BD FACSCalibur и BD FACSCanto II. Данные анализировали при помощи программного обеспечения Weasel версии 3.3 и BD FACSDiva [2, 3]. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы Statistica версии 12 (StatSoft, США) [4].

Результаты и их обсуждение. Воспроизводимость — близость результатов измерений одной и той же величины, полученных в разных лабораториях, разными средствами, разными операторами, в разное время, но приведенных к одним и тем же условиям измерений [5]. Оценивали воспроизводимость 2-х методов идентификации базофилов с использованием разных цитофлуориметров, расположенных в разных лабораториях: BD FACSCalibur в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и BD FACSCanto II в Институте физиологии НАН Беларуси.

Известно, что показателем согласованности (зависимости) между значениями двух переменных является коэффициент корреляции (r). Для оценки того, насколько сильно линейно связаны две переменные, рекомендуется использовать коэффициент

детерминации, который представляет собой квадрат коэффициента корреляции Пирсона (r^2) [6].

Коэффициент детерминации при оценке воспроизводимости гейтирования базофилов по $CD123^+/HLA-DR^-$ составил 0,990 (рисунок 1).

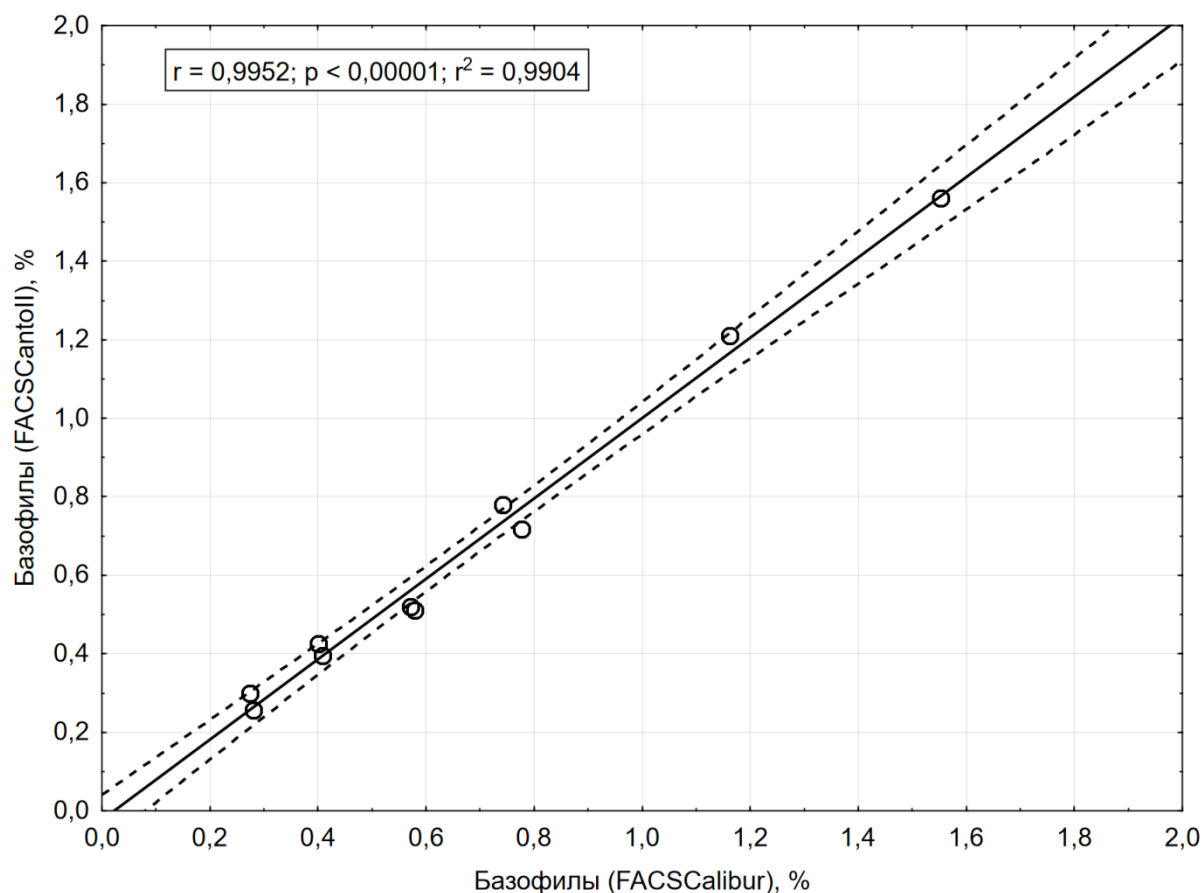


Рисунок 1. — Оценка воспроизводимости гейтирования базофилов с использованием способа $CD123^+/HLA-DR^-$

При идентификации базофилов с использованием способа гейтирования IgE^{hi} , коэффициент детерминации составил 0,973, что несколько ниже такового при применении способа $CD123^+/HLA-DR^-$, тем не менее, укладывается в допустимые пределы для оценки воспроизводимости при фенотипировании клеток методом проточной цитометрии ($r^2 > 0,95$) (рисунок 2) [7, 8].

Повторяемость (сходимость) — близость друг к другу независимых результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, т.е. одним и тем же методом на идентичных объектах, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

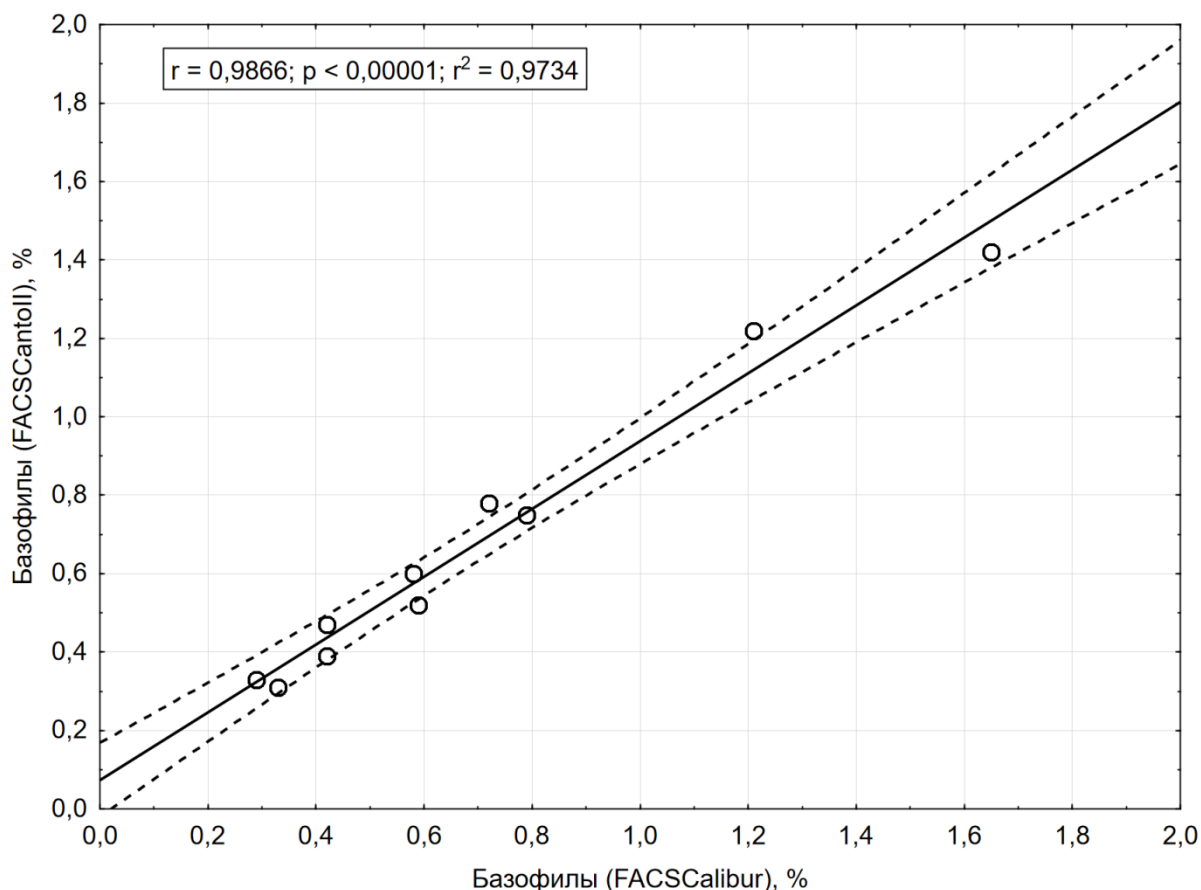


Рисунок 2. — Оценка воспроизводимости гейтирования базофилов с использованием способа IgE^{hi}

Оценка повторяемости при иммунофенотипировании клеток осуществляется, как правило, по коэффициенту вариации (CV) результатов измерений [7–8]. Проведено определение коэффициента вариации при 10-кратном измерении содержания базофилов при помощи двух методов идентификации. Результаты исследования приведены в таблице.

Таблица — Оценка повторяемости методов идентификации базофилов

Наименование клеточной популяции	Результаты измерений										Среднее	CV, %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
IgE ^{hi} базофилы, %	0,82	0,85	0,80	0,80	0,76	0,78	0,78	0,80	0,86	0,80	0,81	3,76
CD123 ⁺ HLA-DR ⁻ базофилы, %	0,81	0,79	0,79	0,89	0,85	0,80	0,82	0,83	0,84	0,86	0,83	3,93

Установлено, что по параметру коэффициента вариации в серии повторных измерений оба метода гейтирования базофилов полностью соответствуют допустимым значениям (до 10 %) [7, 8].

Выводы. Таким образом, способ гейтирования базофилов CD123⁺HLA-DR⁻ позволит получать достоверные результаты для ТАБ вне зависимости от используемого

проточного цитометра, времени и места проведения исследования у одного и того же пациента. Данный способ гейтирования базофилов, используемый для постановки ТАБ, позволит широко внедрить метод диагностики в рутинную практику клинко-диагностических лабораторий.

Литература

1. Романова, И. В. Оптимизация алгоритма гейтирования базофилов на проточном цитометре: многоцветный анализ / И. В. Романова, А. Е. Гончаров, Н. И. Дударева // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2016. — № 4. — С. 15–24.
2. Weasel for Display and Analysis of Flow Cytometry Data [Electronic resource] // Frank Battye — Flow Cytometry Consulting. — Mode of access : <http://www.frankbattye.com.au/Weasel/>. — Date of access : 01.09.2017.
3. BD FACSDiva™ Software [Electronic resource]. — Mode of access : <http://wwwbdbiosciences.com/us/instruments/research/software/flow-cytometry-acquisition/bd-facsdiva-software/m/111112/overview>. — Date of access : 01.09.2017.
4. Spokoiny, V. Basics of Modern Mathematical Statistics / V. Spokoiny, T. Dickhaus. — Berlin: Springer, 2015. — 296 p.
5. ГОСТ 16504–81 — Система государственных испытаний продукции. Испытания и контроль качества продукции. Основные термины и определения. — М.: ИПК Издательство стандартов, 2003. — 24 с.
6. Румянцев, П. О. Статистические методы анализа в клинической практике. Часть I. Одномерный статистический анализ / П. О. Румянцев, В. А. Саенко, У. В. Румянцева // Проблемы эндокринологии. — 2009. — Т. 55, № 5. — С. 48–55.
7. Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS — Part V — Assay performance criteria / B. Wood [et al.] // Cytometry. B. — 2013. — Vol. 84B. — P. 315–323.
8. Evaluation of a flow cytometry method for CD4 T cell enumeration based on volumetric primary CD4 gating using thermoresistant reagents / T. N. Dieye [et al.] // J. Immunol. Meth. — 2011. — Vol. 372. — P. 7–13.

REPEATABILITY AND REPRODUCIBILITY OF DIFFERENT BASOPHIL GATING STRATEGIES

A.Y. Hancharou, I.U. Ramanava

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

The repeatability and reproducibility of two basophil gating strategy IgE^{hi} and $CD123^{+}HLA-DR^{-}$ were estimated. It was shown that both methods had sufficient reproducibility, while the indices of the $CD123^{+}HLA-DR^{-}$ method were slightly higher than the IgE^{hi} method. The repeatability of the two gating approaches met the criteria for flow cytometry and allowing to obtain comparable and reliable results in the allergy testing.

Keywords: repeatability, reproducibility, gating strategy.

Поступила 04.09.2017

ВЫБОР ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ

Романова И.В., Гончаров А.Е.

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

Резюме. Выполнен скрининг иммуноактивных веществ с целью поиска оптимального положительного контроля для постановки теста активации базофилов. Показано, что ИЛ-3, дибутирил-цАМФ, ЛПС и неконъюгированные антитела к fMLPR и FcεRI обладают слабыми стимулирующими свойствами в отношении базофилов и мало пригодны для использования в качестве положительных контролей. ФМА и fMLP приводят к значительному увеличению дегрануляции базофилов, определяемой по маркеру CD63 и могут быть использованы в качестве неспецифических положительных контролей. Для мониторинга специфической отвечаемости базофилов выбрано моноклональное антитело к IgE.

Ключевые слова: базофилы, положительный контроль, проточная цитометрия.

Введение. Тест активации базофилов (ТАБ) впервые был предложен в 1994 году Saint-Laudy [1] и в настоящее время является перспективным методом диагностики аллергии. Данный метод занимает особое место в диагностическом алгоритме реакций гиперчувствительности, так как для его проведения может быть использован теоретически любой аллерген. Так, ТАБ может быть применен для диагностики гиперчувствительности к лекарственным средствам, ядам насекомых, биологическим агентам. Не смотря на продолжительный экспериментальный период на сегодняшний день для проведения ТАБ в разных лабораториях используются существенно отличающиеся между собой протоколы, что указывает на необходимость оптимизации и дальнейшей стандартизации методики с целью практического применения метода.

Цель исследования — провести поиск оптимального положительного контроля для проведения ТАБ.

Материалы и методы исследований. В качестве *объектов исследования* использовали 10 образцов периферической крови здоровых добровольцев (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Кровь забирали натошак из кубитальной вены в количестве 5–6 мл. *Проточная цитометрия.* С целью стимуляции активации и дегрануляции базофилов использовали ряд веществ: человеческий рекомбинантный интерлейкин (ИЛ)-3 — 1 нг/мкл (Miltenyi Biotech, Германия), форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) — 2 нг/мл, дибутирил-цАМФ (дб-цАМФ) — 1 мкг/мл, анти-fMLP — 1 мкл/мл, липополисахарид (ЛПС) *E. Coli* — 100 нг/мл, fMLP — 1 μM (все реагенты производства Sigma-Aldrich, США), моноклональное антитело anti-IgE (клон 4H10 (ExBio, Чехия)) — 1 мкг/мл, моноклональное антитело к FcεRI (клон CRA1, Miltenyi Biotec) — 0,1 мкг/мл. Кровь инкубировали с вышеперечисленными веществами в течение 30 минут при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали фосфатный буферный раствор. Для завершения активации базофилов пробы помещали в –20 °C на 1 минуту (стоп-реакция). После чего добавляли моноклональные антитела CD63 — FITC, клон CLBGran/12 (Beckman Coulter, США), CD123 — PE, клон SSDCLY107D2 (Beckman Coulter, США), HLA-DR — PE-Cy 7, клон Immu-357 (Beckman Coulter, США) (ExBio, Чехия) и инкубировали 15 минут в темноте при 4°C. После инкубации с моноклональными антителами эритроциты лизировали раствором хлорида аммония в течение 15 минут при комнатной температуре. Клетки осаждали центрифугированием 5 минут 250 g и учитывали на проточном цитометре BD FACSCalibur. Данные анализировали при помощи программного обеспечения Weasel

версии 3.0.2 [2]. *Статистический анализ*. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программ Statistica версии 12 (StatSoft, США), StatPlus версии 4.9 (AnalystSoft, Канада) [3]. Значения показателей представлены в виде Me (25 — 75), где Me — медиана, а 25 и 75 — интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей. Для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Корректная интерпретация результатов теста активации базофилов требует наличия надежных отрицательного и положительного контролей. Отрицательный контроль необходим для оценки спонтанной активации базофилов и подразумевает инкубацию клеток в идентичных условиях, что и остальные пробы, но без использования активирующих факторов. Положительный контроль используют для оценки способности базофилов дегранулировать в ответ на неспецифические стимулы, что позволяет исключить ложноотрицательные реакции. В исследовании был задействован ряд иммуноактивных веществ, способных к неспецифической активации клеток иммунной системы. Значения экспрессии CD63 на базофилах под влиянием активирующих веществ приведены на рисунке 1.

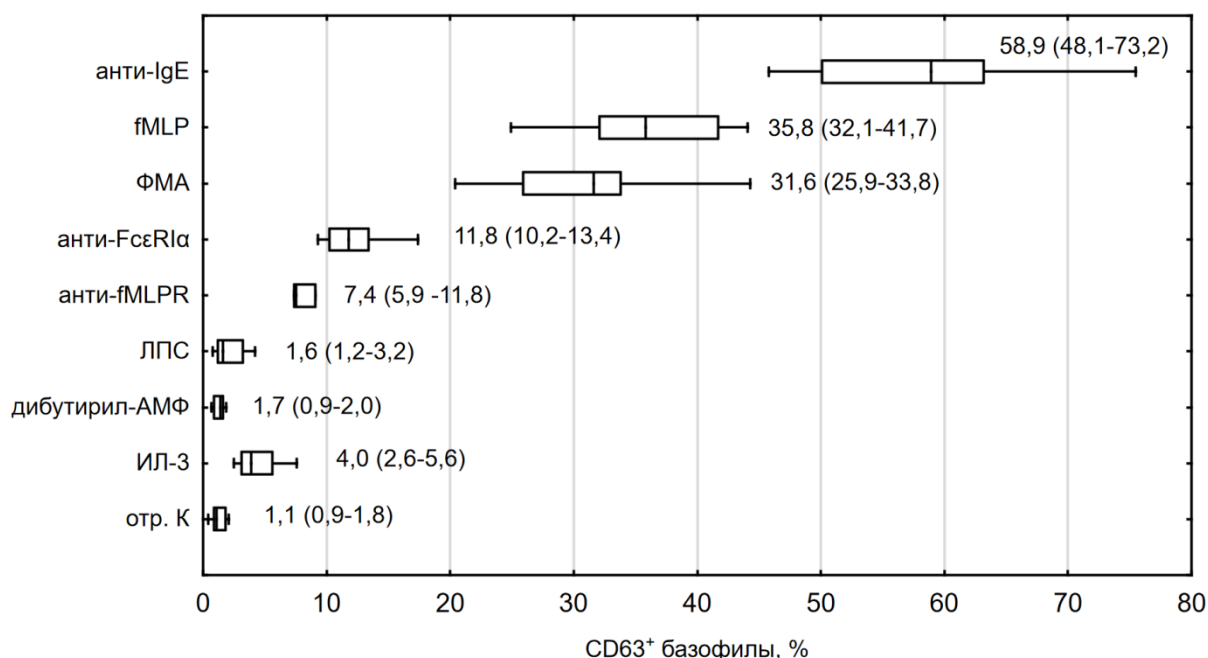


Рисунок 1. — Экспрессия CD63 базофилами под влиянием различных веществ

ИЛ-3 является, в целом, праймирующим агентом для базофилов, который усиливает отвечаемость базофилов на другие стимулы, особенно у пациентов с аллергией [4]. Показано, что ИЛ-3 достоверно усиливает медианные значения интенсивности и процента экспрессии CD63 на базофилах в сравнении с контролем ($p < 0,001$) (рис. 1). В то же время, прирост числа CD63⁺ базофилов сильно варьирует от образца крови и составляет от 1,7 до 9,8 раз. Таким образом, ИЛ-3 целесообразнее использовать для других целей, например, в качестве предварительной стимуляции слабыми аллергенами, в том числе, лекарственными средствами.

Установлено, что дибутирил-цАМФ и ЛПС обладают слабыми стимулирующими свойствами в отношении базофилов ($p=1,0$ и $p=0,347$, соответственно). Отсутствие, а в случае с ЛПС даже некоторое снижение экспрессии CD63 в ряде образцов крови, говорит о неприемлемости их использования в качестве положительного контроля (рисунок 2).

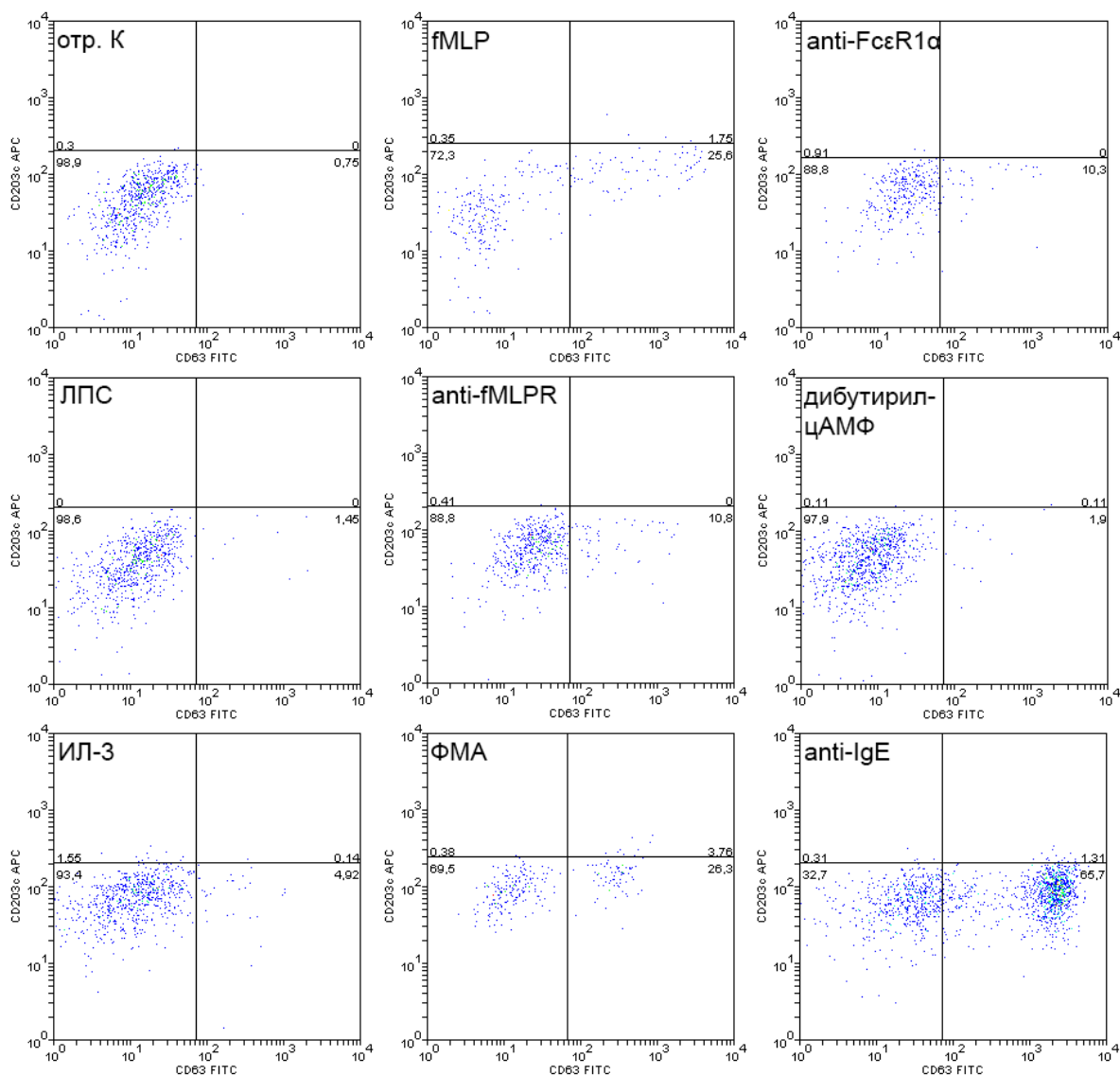


Рисунок 2. — Влияние различных веществ на активацию и дегрануляцию базофилов

Хемотаксический пептид fMLP активирует базофилы по IgE-независимому пути, связываясь с рецептором FPR-1, который активирует MAPK-киназу и фосфолипазу C. Пептид fMLP связывается с двумя рецепторами, экспрессируемых на базофилах, рецептор к формил-пептиду (FPR) и формил-пептид—подобный рецептор 1 (FPRL1). Данные рецепторы активируют внутриклеточные пути активации такие, как MEK—ERK путь, что приводит к хемотаксису и высвобождению медиаторов, включая лейкотриен C4 и гистамин [5]. Нами было использовано моноклональное антитело к рецептору fMLP, имитирующее воздействие fMLP. Показано, что данное вещество приводит к активации базофилов, с медианными значениями экспрессии CD63 достоверно отличающимися от отрицательного контроля ($p=0,01$). При этом, как и в случае с ИЛ-3, степень изменения экспрессии под влиянием anti-fMLPR существенно различалась в исследованных образцах крови и составила от 4,2 до 22,8 раз, а количество CD63⁺ базофилов, как правило, не превышало 10 %. В тоже время чистый fMLP в концентрации 1 μM может быть с успехом использован в качестве неспецифического контроля (CD63 — 35,8 (32,1–41,7) %).

Механизмом действия ФМА на клетки является активация протеинкиназы С, что делает ФМА, фактически, универсальным активатором иммунокомпетентных клеток. Первоначальная концентрация ФМА, которая была использована в экспериментах, составляла 20 нг/мл, исходя из предшествующих исследований других клеточных популяций, а также данных литературы [6, 7]. Однако при этом, даже после кратковременной инкубации (30 мин.) наблюдалось большое количество клеток, подвергшихся апоптозу или некрозу, что существенно затрудняло выделение региона базофилов на цитограммах. Была поставлена серия экспериментов, которые позволили определить оптимальную концентрацию ФМА — 2 нг/мл. Такая концентрация, с одной стороны, приводит к выраженной дегрануляции базофилов, определяемой по маркеру CD63 (значения экспрессии CD63 выше 20 % во всех образцах), в то же время, не изменяет существенно показатели жизнеспособности клеток и не нарушает распределение клеток на цитограммах светорассеяния.

Таким образом, в результате исследований в качестве положительного контроля с целью неспецифической активации базофилов нами выбран ФМА в невысокой концентрации (2 нг/мл). Помимо достаточной активации базофилов, выбор также обусловлен невысокой стоимостью реагента.

Учитывая, что существует такой феномен как «неотвечающие базофилы», с целью исключения получения ложноотрицательных результатов, необходимо использовать такой положительный контроль, который имитировал бы IgE-опосредованную специфическую активацию базофилов [8]. С данной целью было использовано моноклональное антитело к IgE (клон 4H10). Показано, что процент дегранулирующих базофилов с применением данного положительного контроля составляет 58,9 (50,1–63,2) % по маркеру CD63, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к положительному контролю реакции. В то же время, использование моноклонального антитела к FcεR1α приводило к значительно более низким показателям процента дегранулировавших базофилов ($p=0,01$ в сравнении с anti-IgE) (рисунок 1).

Выводы. Показано, что дибутирил-цАМФ, ЛПС не изменяют достоверно активацию базофилов в сравнении с отрицательным контролем. ИЛ-3 и неконъюгированное антитело к fMLPR обладают слабыми стимулирующими свойствами в отношении базофилов и малопригодны для использования в качестве положительных контролей.

ФМА и fMLP приводят к значительному достоверному увеличению дегрануляции базофилов, определяемой по маркеру CD63. С целью неспецифической активации базофилов нами выбран ФМА в концентрации 2 нг/мл. Помимо достаточной активации базофилов, выбор также обусловлен невысокой стоимостью реагента.

Для оценки специфической отвечаемости базофилов выбрано антитело к IgE, которое обладает значительно более выраженной стимулирующей активностью в отношении базофилов в сравнении с антителом к FcεR1α.

Литература

1. Sainte-Laudy, J. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis / J. Sainte-Laudy, C. Vallon, J. C. Guérin // *Allerg. Immunol. (Paris)*. — 1994. — Vol. 26, N 6. — P. 211–214.
2. WEASEL for flow cytometry [Electronic resource] // The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research. — Mode of access : <http://www.frankbattye.com.au/Weasel/index.html>. — Date of access : 19.06.2016.
3. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. — Москва, 2008. — 312 с. — С. 13.

4. Schroeder, J.T. Human Basophils Secrete IL-3: Evidence of Autocrine Priming for Phenotypic and Functional Responses in Allergic Disease / J.T. Schroeder, K.L. Chichester, A.P. Bieneman // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 182, № 4. — P. 2432–2438.

5. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2 / A. de Paulis [et al.] // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 173, № 9. — P. 5739–5748.

6. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine / P. Filipazzi [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 2007. — Vol. 25, № 18. — P. 2546–2553.

7. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells / H. Kopf [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* — 2007. — Vol. 7, № 13. — P. 1819–1824.

8. Flow-assisted allergy diagnosis: current application and future perspectives / D.G. Ebo [et al.] // *Allergy.* — 2006. — Vol. 61, № 9. — P. 1028–1039.

SELECTION OF A POSITIVE CONTROL FOR OPTIMIZATION OF THE BASOPHIL ACTIVATION TEST

I.U. Ramanava, A.Y. Hancharou

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

The screening of the immunoactive substances suitable for use as the positive controls for the basophil activation test was performed. It was shown that IL-3, LPS, dibutyryl-cAMP and antibody to fMLPR possessed weak stimulatory activity on the basophil degranulation. The antibody to FcεRI also induced insufficient activation of basophils. PMA and fMLP were selected as two optimal non-specific positive controls. Specific positive control — anti-IgE was selected allowing to assess specific responsiveness of basophils.

Keywords: basophils, positive control, flow cytometry.

Поступила 04.09.2017

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 2–3 ноября 2017 г.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ *CANDIDA ALBICANS* НА СРЕДЕ САБУРО С 2,3,5–ТРИФЕНИЛТЕТРАЗОЛИЯ ХЛОРИСТЫМ

В.В. Буткевич, Ж.Ф. Циркунова, И.Н. Слабко, Н.Н. Бердник

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Ключевые слова: *Candida albicans*, среда Сабуро, идентификация, морфологические варианты, 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид, кандидоз.

Введение. В последние годы возрастает интерес к проблеме кандидоза, являющегося распространенным грибковым заболеванием. Наиболее частым возбудителем кандидозов был и остается вид *Candida albicans*. В литературе описаны различные методы видовой идентификации грибов рода *Candida*, в частности, тест на восстановление 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) [1].

Известно, что благодаря функционированию электронно-транспортной цепи живые клетки способны поглощать и восстанавливать неокрашенные растворы солей тетразолия в окрашенный и во многих случаях флуоресцирующий восстановленный продукт — формазон. Чем более жизнеспособна клеточная популяция, тем интенсивнее и быстрее проявляется окраска [2].

Данный тест положен в основу многочисленных методов для учета жизнеспособности бактерий, определения токсичности различных веществ, изучения эффектов внешних факторов на бактериальные клетки и т.д. [2].

Интенсивность окраски колоний *Candida spp.* после инкубации на среде с ТТХ может служить одним из дополнительных диагностических признаков. В случае принадлежности исследуемых изолятов к *C. albicans*, выросшая в течение 24–48 ч культура дает на данной среде обильный пастообразный матовый беловато-кремовый рост. Наличие розового или красного окрашивания культуры исключает ее принадлежность к виду *C. albicans* [1].

Цель работы: изучить макроморфологические варианты *C. albicans* на среде Сабуро с ТТХ.

Материалы и методы. Объектами исследования явились клинические изоляты *C. albicans* (n=77), выделенные в 2016–2017 гг. от пациентов, находящихся на стационарном лечении в отделениях различного профиля (пульмонология, хирургия, реанимация, ЛОР, онкология, стоматология) г. Минска. Видовую идентификацию полученных культур проводили с помощью автоматического анализатора Vitek2Compact (BioMérieux). В качестве типовой тест-культуры использовали *C. albicans* ATCC 10231.

Инокулом готовили из 5 типичных колоний 24-часовой культуры, суспендируя их в 5 мл 0,85 % стерильного раствора NaCl до соответствия стандарту мутности 0,5 McFarland. Контроль оптической плотности суспензии осуществлялся денситометрически. Полученную суспензию наносили по 0,02 мкл на поверхность агаризованной среды Сабуро с хлорамфениколом с добавлением ТТХ (0,1 г/л среды). Посевы инкубировали при температуре 37±1°C в течение 6 дней.

Результаты и их обсуждение. Культивирование *C. albicans* на среде Сабуро с ТТХ в течение 6 суток выявило различия в макроморфологии грибов (рисунок).

Показано, что подавляющее большинство (58,4 %) изученных клинических изолятов *C. albicans* (в том числе и *C. albicans* ATCC 10231) принадлежали к морфотипу 1. 22 % культур по своей макроморфологии относились к морфотипу 2. Оставшиеся 19,6 % грибов распределились следующим образом: морфотип 3 — 6,49 % изолятов, морфотип 4 и 5 — по 1,3 %, морфотип 6 — 3,9 %.

Следует отметить, что интенсивность окраски колоний *C. albicans* менялась в процессе роста микромицетов: от беловато-кремового или беловато-розового на 1–2 сутки культивирования до темно розовых или темно фиолетовых — на 6 сутки.

Восстановление ТТХ в окрашенный формазон происходит за счет таких окислительно-восстановительных ферментов как дегидрогеназы, интенсивность окрашивания зависит от уровня образования и активности данных ферментов.

Полученные нами результаты свидетельствуют о различиях в ферментативных системах близкородственных штаммов внутри одного вида. Данное различие может быть использовано для внутривидового типирования *Candida spp.*

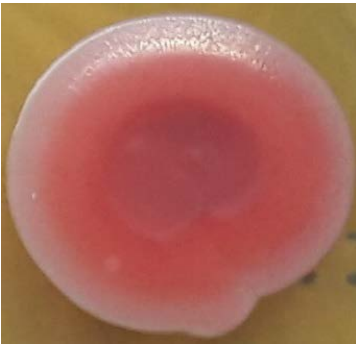





		
<p>Морфотип 1 — колонии гладкие, круглые, темно-розовые, край колоний ровный, золотистый</p>	<p>Морфотип 2 — колонии круглые с фестончатым краем, светло-розовые, край колоний золотистый</p>	<p>Морфотип 3 — колонии круглые с фестончатым краем, бледно-фиолетовые, край колоний золотистый</p>
		
<p>Морфотип 4 — колонии круглые с фестончатым краем, темно-фиолетовые, край колоний золотистый</p>	<p>Морфотип 5 — колонии круглые, морщинистые, темно-розовые, край колоний ровный, золотистый</p>	<p>Морфотип 6 — колонии гладкие, круглые, белые, слегка розоватые, край колоний ровный</p>

Рисунок — Макроморфология *C. albicans* при росте на среде Сабуро с добавлением трифенилтетразолия хлорида в течение 6 сут.

Литература

1. Мороз, А. Ф. Грибы рода *Candida* (Методы выделения, идентификации на видовом уровне и определение чувствительности к противогрибковым препаратам): метод. рекомендации / А. Ф. Мороз, А. Е. Снегирева. — М., 2009. — 56 с.
2. Мажуль, М. М. Действие солей тетразолия на биолюминесцентную активность рекомбинантного штамма *Escherichia coli* / М. М. Мажуль, В. С. Данилов // Биотехнология. — 2002. — № 4. — С. 91–96.

MORPHOLOGICAL VARIANTS OF *CANDIDA ALBICANS* ON SABOURAUD MEDIUM WITH 2,3,5-TRIPHENYLTETRAZOLIUM CHLORIDE

V.V. Butkevich, Zh.F. Tsirkunova, I.N. Slabko, N.N. Berdnik

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Objective of the study was to investigate macromorphological variants of *Candida albicans* on Sabouraud medium with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. The results obtained shown differences in enzymatic systems of closely related strains within one species. This difference can be used for intraspecific typing of *Candida spp.*

Keywords: *Candida albicans*, Sabouraud medium, identification, morphological variants, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, candidiasis.

Поступили 28.09.2017

ДИНАМИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА СКАРЛАТИНЫ В ЗАВОДСКОМ РАЙОНЕ Г. МИНСКА

А.М. Дронина¹, М.И. Бандацкая², Т.С. Ланкевич², В.С. Лойко²

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

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Ключевые слова: скарлатина, заболеваемость, многолетняя динамика, годовая динамика, группы риска.

Скарлатина возникает у лиц, не имеющих антитоксического иммунитета, при их инфицировании высокотоксигенными сероварами β гемолитического стрептококка группы А. Антитоксический иммунитет защищает переболевших скарлатиной лиц от повторных случаев заболевания. Поэтому имеются различия в заболеваемости скарлатиной населения разного возраста. В период реализации программы элиминации кори и краснухи среди аэрозольных антропонозных экзантемных инфекций скарлатина имеет существенное значение в структуре заболеваний детей, особенно детей, посещающих учреждения дошкольного образования (УДО), и после ветряной оспы занимает 2 место. Таким образом, научный и практический интерес представляют особенности проявлений эпидемического процесса скарлатины в крупном районе промышленного города.

Материалом исследования послужили данные официальной регистрации заболеваемости скарлатиной (уч.ф.01 — годовая, ф.060–у), данные о численном составе детского населения Заводского района г. Минска в 1996 — 2016 гг. Нами выполнено сплошное, ретроспективное, продольное исследование. Тенденцию многолетней динамики заболеваемости определяли методом наименьших квадратов и оценивали

по среднему темпу прироста, периодичность оценивали по отношению к параболе 1 порядка с учетом отклонения фактических показателей заболеваемости от линии тенденции, превышающих доверительные интервалы (p_1 , p_2) с уровнем доверия 95 %. Годовую динамику заболеваемости изучали по типовой и индивидуальным кривым. Для анализа сезонности рассчитывали верхний предел круглогодичной заболеваемости по таблицам распределения Пуассона. Достоверность различий сравниваемых интенсивных показателей оценивали по критерию Стьюдента t .

В 1996–2016 гг. заболеваемость скарлатиной в Заводском районе находилась в пределах от 4,7 на 100 000 в 2015 и 2016 гг. до 34,5 на 100 000 в 1997 г. Многолетняя динамика характеризовалась выраженной тенденцией к снижению со средним темпом прироста -6,7 % ($p < 0,001$). В зависимости от интенсивности эпидемического процесса в многолетней динамике заболеваемости скарлатиной в Заводском районе можно выделить 3 периода: высокой (до 1998 гг.), средней (1999–2006 гг.) и низкой заболеваемости (2007–2016 гг.). Среднегодовой показатель заболеваемости в период с 1996 по 1998 г. составил $27,5 \pm 3,3$ на 100 000, в 1999–2006 гг. был ниже в 2 раза ($p < 0,001$) и составил $13,9 \pm 2,4$ на 100 000, а в 2007–2016 гг. был ниже в 1,7 раза, чем в предыдущем периоде ($p < 0,05$) и в 3,5 раза ($p < 0,001$), чем в период 1996–1998 гг., и составил $8,0 \pm 1,8$ на 100 000. Для многолетней динамики второго периода была характерна стабильная тенденция. Два первых периода характеризовались выраженной периодичностью. Длина периода в годы со средним уровнем заболеваемости составила 4 года, амплитуда — 12,4 на 100 000. В годы низкой заболеваемости многолетняя динамика характеризовалась выраженной тенденцией к снижению со средним темпом прироста -10,7 % ($p < 0,05$). Периодичность не определялась: все отклонения фактических показателей заболеваемости от линии тенденции не выходили за 95 % доверительные интервалы и, вероятнее всего, обусловлены случайными колебаниями значения показателя заболеваемости.

Многолетняя динамика заболеваемости скарлатиной в Заводском районе синхронна с заболеваемостью в других районах города Минска, что свидетельствует о едином эпидемическом процессе этой инфекции на территории города. Статистически значимые различия с заболеваемостью в среднем по городу (исключая Заводской район) были лишь 6 лет из 21 года наблюдений. При этом выше заболеваемость была только в 2006 г. В 1996, 1998, 2003, 2012 и 2016 гг. заболеваемость была ниже среднегородского уровня ($p < 0,05$).

Низкая активность эпидемического процесса стрептококковой инфекции в последнее десятилетие может быть обусловлена многими факторами. С 2007 года изменились требования к организации эпидемиологического надзора за стрептококковой инфекцией, а также некоторые подходы к организации противоэпидемических мероприятий в очагах в соответствии с Инструкцией Министерства здравоохранения Республики Беларусь 3.1.2.10–18–8–2006 «Эпидемиологический надзор и профилактика стрептококковой (группы А) инфекции». Кроме того, бактериальные инфекции в организме обостряются, приобретают клинически выраженную форму часто после вирусной инфекции. Поэтому активность эпидемического процесса стрептококковой инфекции зависит и от уровня заболеваемости вирусными респираторными инфекциями. В период повышения заболеваемости вирусными респираторными инфекциями и сразу после него увеличивается распространение β -гемолитического стрептококка группы А, что приводит к увеличению количества пациентов с респираторными заболеваниями стрептококковой этиологии и бактерионосителей. Эти категории являются источниками возбудителя инфекции для восприимчивых к β -гемолитическим стрептококкам группы А детей, никогда ранее с ним не встречавшихся, у которых

развивается скарлатина. Последние десять лет шире используются сплит и субъединичные вакцины против гриппа, что существенно повлияло на эпидемический процесс этой инфекции. Также была установлена действенность вакцинации против гриппа в улучшении здоровья в группе привитых детей, относящихся к группе часто и длительно болеющих, в уменьшении количества детей, часто болеющих острыми респираторными инфекциями, уменьшении количества эпизодов острых респираторных инфекций за год у одного ребенка. Нами установлена сильная обратная корреляционная зависимость между охватом прививками против гриппа в 2010–2016 г. и заболеваемостью скарлатиной: коэффициент корреляции составил $-0,79$ ($p < 0,05$).

Анализ годовой динамики заболеваемости скарлатиной по типовым кривым показал, что в период высокой заболеваемости (1996–1998 гг.) для годовой динамики была характерна выраженная сезонность. С июня по август заболевания не регистрировались, с сентября до апреля отмечался рост заболеваемости, в мае заболеваемость снижалась, в июне-августе заболевания не регистрировались. Сезонный подъем длился 6,5 месяцев (с конца ноября до июня), максимальный показатель заболеваемости превышал верхний предел круглогодичной заболеваемости (интенсивность сезонного подъема) в 6,5 раз. В период 1999–2006 гг. снижение уровня заболеваемости произошло за счет изменения сезонной заболеваемости, которая снизилась в 18,2 раза ($p < 0,001$). Уровень круглогодичной заболеваемости увеличился на 47 % ($p > 0,05$). В целом заболевания более равномерно распределялись на протяжении года. При этом сохранились общие закономерности годовой динамики: минимальные уровни заболеваемости регистрировались летом (август), с сентября по-прежнему отмечался рост, который останавливался в ноябре, и почти на одном уровне заболеваемость регистрировалась до начала лета, с июня снижалась. Сезонный подъем сократился до полутора месяцев, интенсивность его по типовой кривой составила только 1,16. В третьем периоде (2007–2016 гг.) сохранились основные закономерности динамики предыдущего периода, но при этом снизился уровень круглогодичной заболеваемости в 1,9 раза ($p < 0,05$), уровень сезонной заболеваемости остался прежним. На типовой кривой верхний предел круглогодичной заболеваемости был превышен только в декабре и апреле. Анализ годовой динамики заболеваемости по индивидуальным кривым показал, что в третьем периоде ежегодные сезонные подъемы заболеваемости были меньшей интенсивности. Отсутствие многолетней периодичности было обусловлено низкой интенсивностью сезонной заболеваемости. Наиболее продолжительный и интенсивный сезонный подъем был с октября 2009 до мая 2010 г., когда была пандемия гриппа. С 2010 г. уровень сезонной заболеваемости скарлатиной ежегодно уменьшался, охват прививками против гриппа в Минске увеличился с 21 % в 2010 г. до 40 % в 2016 г. Коэффициент корреляции сезонной заболеваемости скарлатиной в 2010–2016 гг. и охвата прививками против гриппа составил $-0,97$ ($p < 0,001$).

До 1999 г. заболеваемость скарлатиной не регистрировалась с июня до конца лета. С 2000 г. заболевания в июне регистрируются ежегодно. Это может быть связано с увеличением риска инфицирования при объединении на летний период групп дошкольников в июне.

В социально-возрастных группах в периоды с разной интенсивностью эпидемического процесса группой риска были дети дошкольного возраста, посещающие организованные коллективы ($p < 0,05$). Среди детей, не посещающих организованные коллективы, и взрослых регистрировались единичные случаи заболеваний. Так за 21 год наблюдений скарлатиной заболело только 4 взрослых, 3 ребенка до 2 лет и 6 детей 3–6 лет, не посещающих организованные коллективы.

Риски заражения могут зависеть от наполняемости групп в детских коллективах, соответствия фактического количества детей проектной мощности учреждения и действующим техническим нормативным правовым актам. Ранее нами было показано, что активность эпидемического процесса выше в районах, где выше наполняемость групп в УДО. В Первомайском районе г. Минска средняя наполняемость групп ясельного возраста в 2016 году составила 23,85 ребенка на 1 учреждение, садового возраста — 22,5 ребенка, в Партизанском районе — 19,6 и 19,5. В Заводском районе в 2016 г. функционировало 67 УДО, 596 групп, которые посещали 10 916 детей, то есть в среднем 18,3 человека на группу. Заболеваемость скарлатиной в Заводском районе в 2016 г. (4,7 на 100 000), была ниже в 1,8 и 1,5 раза, чем в Первомайском и Партизанском районах.

В зависимости от интенсивности эпидемического процесса в многолетней динамике заболеваемости скарлатиной в Заводском районе можно выделить 3 периода: высокой (до 1998 гг.), средней (1999–2006 гг.) и низкой заболеваемости (2007–2016 гг.). В последнее десятилетие многолетняя динамика заболеваемости скарлатиной приобрела выраженную тенденцию к снижению, уменьшилась активность периодических факторов. Эпидемическая ситуация в Заводском районе была схожа с заболеваемостью в других районах города Минска, что свидетельствует о едином эпидемическом процессе этой инфекции на территории города. Влияние сезонных факторов на заболеваемость скарлатиной существенно снизилось, в наибольшей степени после 2010 г. Группой риска были дети дошкольного возраста, посещающие организованные коллективы ($p < 0,05$). В районах города с меньшей наполняемостью групп УДО, интенсивность эпидемического процесса скарлатины меньше.

DYNAMICS OF THE SCARLET FEVER EPIDEMIC PROCESS IN ZAVODSKY DISTRICT IN MINSK CITY

A.M. Dronina¹, M.I. Bandatskaya², T.S. Lankevich², V.S. Loiko²

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Depending on the intensity of the epidemic process in the long-term dynamics of the incidence of scarlet fever in the Zavodsky district, three periods can be distinguished: high (up to 1998), medium (1999–2006) and low incidence (2007–2016). In the last decade, the long-term dynamics of scarlet fever has acquired a pronounced tendency to decrease; the activity of periodic factors has decreased. The risk group was pre-school children attending organized groups ($p < 0.05$). In the city districts with fewer filling groups of pre-school institutions, the intensity of the epidemic process of scarlet fever is less.

Keywords: scarlet fever, morbidity, long-term dynamics, annual dynamics, risk groups.

Поступили 25.09.2017

ЛАБОРАТОРНО ПОДТВЕРЖДЕННЫЕ СЛУЧАИ КОКЛЮША: ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ, СЕЗОННОСТЬ, ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРА

В. Л. Колодкина, В. С. Мартынов

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

Резюме. Несмотря на очевидные успехи проводимой массовой иммунизации детского населения и высокий уровень охвата профилактическими прививками, коклюш продолжает быть проблемой здравоохранения, сохраняются подъемы и спады заболеваемости. Проведен анализ лабораторно подтвержденных случаев коклюша, зарегистрированных в 2012–2016 гг., в период, когда в Беларуси широко использовались ПЦР и ИФА методы для верификации случаев коклюша/паракоклюша. Показатель на 100 000 населения лабораторно подтвержденных случаев коклюша был выше и составил 5,27; 1,37; 4,08; 4,89; 6,42 соответственно в 2012, 2013, 2014, 2015 и 2016 гг. против показателя заболеваемости в 2007, 2008, 2009, 2010, 2011 гг. соответственно 1,62; 1,29; 0,96; 1,18; 1,59. Заболеваемость коклюшем в Беларуси не имеет четкой сезонности как многие другие респираторные инфекции. Наиболее высокая заболеваемость регистрировалась среди детей 0–5 мес. Далее отмечалось снижение заболеваемости с возрастом. Небольшой подъем регистрировался среди детей 6–9 лет.

Ключевые слова: коклюш, показатель заболеваемости, сезонность, возрастная структура.

Введение. Специфическая массовая иммунизация детского населения АКДС-вакциной, введенная в широкую практику в 1958–1960 гг., привела к резкому снижению заболеваемости коклюшем. Если в довакцинальный период (1945–1957 гг.) в Республике Беларусь среднемноголетний показатель заболеваемости составлял 134,7 на 100000 населения, то в 2011 г. он снизился до 1,59 на 100 000. Однако, как во многих странах мира, в том числе и в нашей стране, несмотря на высокий охват прививками, коклюш превосходит по уровню заболеваемости все другие вакциноуправляемые инфекции [1]. Традиционно подтверждение диагноза коклюша/паракоклюша основывалось на бактериологическом методе, эффективность которого является низкой, и постановке реакции агглютинации (РА), выявляющей антитела, индуцированные агглютиногенами возбудителя [2]. С 2012 г. в Республике Беларусь проводится расширенная диагностика данной инфекции. Для лабораторной верификации случаев используются такие высокочувствительные и специфичные методы как ПЦР и ИФА.

Цель исследования — оценить ситуацию по коклюшной инфекции в годы проведения расширенной ее диагностики.

Материалы и методы. За период 2012–2016 гг. в лабораторию вакциноуправляемых инфекций поступил клинический материал от 5191 пациента с подозрением на коклюш/паракоклюш. С использованием двух методов — бактериологического и ПЦР — обследованы 582 пациента, только методом ПЦР — 4225, только серологическим методом (ИФА) — 966, серологическим и в ПЦР — 964.

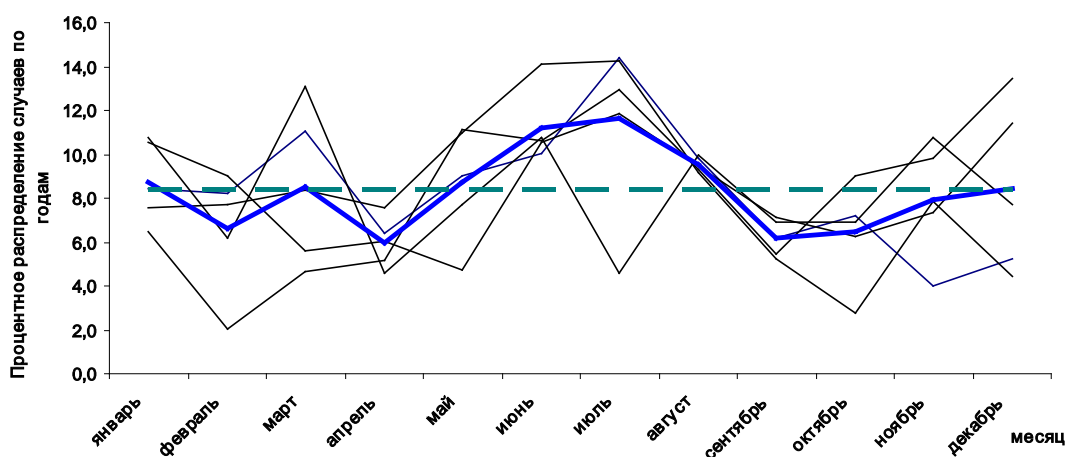
Для исследования бактериологическим методом носоглоточные мазки в транспортной среде Amies культивировали на кровяно-угольном агаре (с добавлением цефалексина в концентрации 40 мкг/мл) в течение 3–7 суток при +37°C. Чашки с посевом анализировали ежедневно, подозрительные колонии отсеивали и идентифицировали.

Носоглоточные мазки исследовались с использованием разработанного нами метода ПЦР в режиме реального времени, основанном на обнаружении ДНК *B. pertussis* по мишеням IS481 и BP0026 и ДНК *B. parapertussis* по мишени IS1001 [3].

Для серологических исследований применяли коммерческую тест-систему SERION ELISA classic Bordetella pertussis Toxin IgG (Virion/Serion, Германия) для обнаружения иммуноглобулинов G к коклюшному токсину. Серологическая диагностика коклюша основывалась на 4-х кратном нарастании IgG к коклюшному токсину в парных сыворотках или на выявлении диагностического титра (100 МЕ/мл и более) этих антител при использовании одной сыворотки, взятой не ранее 21 дня от начала кашля и не ранее 1 года после последней прививки.

Результаты и их обсуждение. За период с 2012 по 2016 гг. доля выявленных позитивных на коклюш лиц среди пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш сохранялась практически на одном уровне и составила 39,2 %, 26,7 %, 37,6 %, 42,2 %, 47,0 % соответственно. Доля лиц, позитивных на паракоклюш, была значительно ниже, и также сохранялась на одном уровне — менее 1 %, на протяжении этого периода. Показатель на 100 000 населения лабораторно подтвержденных случаев коклюша составил 5,27; 1,37; 4,08; 4,89; 6,42 соответственно в 2012, 2013, 2014, 2015 и 2016 гг. В предыдущие пять лет (2007 — 2011 гг.), когда диагностика коклюша в основном осуществлялась на основании клинических данных или данных бактериологического исследования и серологического метода РА, показатель заболеваемости коклюшем был ниже и составлял 1,62; 1,29; 0,96; 1,18; 1,59 соответственно.

Анализ результатов ежемесячной заболеваемости коклюшем по лабораторно верифицированным данным свидетельствует, что заболеваемость коклюшем в Беларуси не имеет четкой сезонности как многие другие респираторные инфекции. В течение всего наблюдаемого периода времени случаи коклюша регистрировались во все месяцы. При этом показатели ежемесячной заболеваемости в разные годы отличались. Однако средние значения на основе данных за 5 лет демонстрируют, что более низкая заболеваемость отмечается с февраля по апрель и с сентября по ноябрь, повышение числа выявленных случаев инфекции имеет место с июня по август (рисунок).



- Помесячное распределение случаев, 2012–2016 гг.
- Среднее ежемесячное распределение случаев
- Средний процент случаев, если во всех месяцах регистрировалось одинаковое их число

Рисунок — Сезонность лабораторно подтвержденных случаев коклюша в Беларуси, 2012–2016 гг., (n = 2090)

Анализ возрастного распределения лабораторно подтвержденных случаев коклюша показал, что наиболее высокая заболеваемость регистрировалась среди детей 0–5 мес. Далее отмечалось снижение заболеваемости с возрастом. Небольшой подъем регистрировался среди детей 6–9 лет. Данная тенденция сохранялась на протяжении пяти лет наблюдения (таблица).

Таблица. Лабораторно подтвержденные случаи коклюша в Беларуси за 2012–2016 гг. (n=2090)

Возраст	Число случаев по годам (показатель заболеваемости на 100 000)				
	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2016 г.
0–2 мес.	39 (13,42)	8 (27,53)	39 (131,46)	37 (124,72)	56 (188,77)
3–5 мес.	59 (20,30)	12 (41,30)	41 (138,20)	41 (138,20)	64 (215,73)
6–18 мес.	82 (7,25)	17 (15,04)	66 (55,62)	67 (56,46)	91 (76,69)
19 мес. –5 лет	109 (2,27)	31 (6,45)	54 (10,71)	99 (19,63)	87 (17,25)
6–9 лет	111 (3,10)	32 (8,94)	101 (25,70)	97 (24,68)	154 (39,18)
10–15 лет	72 (1,34)	17 (3,15)	68 (12,72)	74 (13,84)	100 (18,70)
16–25 лет	8 (0,06)	3 (0,23)	3 (0,27)	16 (1,43)	10 (0,90)
26 лет и старше	19 (0,03)	10 (0,15)	15 (0,22)	33 (0,49)	48 (0,71)

Заключение. В годы проведения расширенной диагностики коклюшной инфекции (2012–2016) число выявленных случаев за исключением 2013 было выше, в сравнении с предыдущими годами (2007–2011). Для данной инфекции не характерна четкая сезонность, однако в среднем более высокая заболеваемость наблюдается в летние месяцы. Наиболее подверженными коклюшу являются дети 0–5 мес., не прошедшие полный курс вакцинации, и дети в возрастной группе 6–9 лет, что обусловлено утратой поствакцинального иммунитета.

Литература

1. Edwards, K. M. Pertussis epidemiology and transmission / K. M. Edwards // Adv. Stud. Med. — 2005. — Vol. 5 — P. 440–443.
2. Ценева, Г. Я. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша / Г. Я. Ценева, Н. Н. Курова // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 2003. — Т. 5, № 4. — С. 329–341.
3. Kolodkina, V. L. Multiplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* / V. L. Kolodkina, V. S. Martynov, A. Babenko // Iran. J. Microbiol. — 2014. — Vol. 6. — P. 346–354.

LABORATORY CONFIRMED PERTUSSIS CASES: MORBIDITY, SEASONALITY, AGE DISTRIBUTION

V. L. Kolodkina, V. S. Martinov

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

This paper describe the epidemiology of laboratory-confirmed pertussis in Belarus during the period from 2012 to 2016 when PCR and ELISA methods are used for the diagnosis of infection. The incidence of laboratory-confirmed pertussis was 5.27; 1.37; 4.08; 4.89; 6.42 in 2012, 2013, 2014, 2015 and 2016 respectively. It is evident that pertussis in Belarus is not as seasonal as many other respiratory tract infections. There was however a tendency towards a lower occurrence in the months of February to April, of September to November and a higher occurrence in the months of June to August. In the study period, the highest incidence was among children 0–5 month with incidences between 17 and 202 per 100,000. A small rise was recorded among children aged 6–9 years. This trend persisted for the last five years. As follows from the above, it is more likely that the increase incidence pertussis in the country in the last five years is due to an improvement in the diagnosis of pertussis infection.

Keywords: pertussis (whooping cough), incidence rate, seasonality, age distribution.

Поступили 20.09.2017

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА С ЛЕЙКОЦИТАМИ ОПУХОЛИ МЕТОДОМ ИНТРАВИТАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

В. Науменко^{1,2}, Д. Махони², К. Дженни²

¹*Национальный исследовательский технический университет «МИСиС», Москва, Россия*

²*Университет Калгари, Калгари, Канада*

Ключевые слова: онколитический вирус, иммунотерапия рака.

Использование онколитических вирусов является перспективным подходом в лечении опухолей. В основе онколитической виротерапии лежит селективная гибель опухолевых клеток в результате вирусной инфекции, а также стимуляция противоопухолевого иммунного ответа. Эффективная доставка вируса к опухоли при внутривенном введении остается не решенной проблемой, что во многом связано с недостаточным пониманием механизмов взаимодействия вируса с опухолевым микроокружением. В большинстве клинических исследований используют несколько доз вируса, которые вводят внутривенно с интервалом 24–72 ч, при этом ничего не известно о том, как влияет первичная инфекция на доставку последующих доз вируса.

Цель работы заключалась в изучении взаимодействий первой и второй дозы вируса везикулярного стоматита с лейкоцитами опухоли. Для этого был разработан метод интравитальной микроскопии опухолевого микроокружения, позволяющий наблюдать за вирусными капсидами, распространением инфекции в опухоли и местным иммунным ответом.

Показано, что через несколько минут после внутривенного введения первой дозы вирус контактирует с эндотелием сосудов и нейтрофилами в опухоли толстого кишечника мыши (опухолевая модель СТ-26). Для повторного введения вируса (через 24–72 ч после первой дозы) была характерна другая картина распределения

в опухолевом микроокружении: большая часть вирусных капсидов связывалась с опухолевыми моноцитами/макрофагами, экспрессирующими CD11b, F4/80 и CD169. Кроме того были выявлены многочисленные контакты нейтрофилов с моноцитами, адсорбирующими вирус на своей поверхности, а также изменение активности нейтрофилов. При анализе вирусной инфекции было показано, что инфицирующая способность первой дозы в 100 раз выше, чем второй. В то же время эффективность монотерапии оказалась значительно ниже, чем при двукратном введении вируса, что указывает на необходимость повторного введения вируса для успешной виротерапии опухолей. При этом деплеция моноцитов перед введением второй дозы нивелировала ее терапевтический эффект, а деплеция нейтрофилов, напротив, приводила к более выраженному противоопухолевому ответу.

Полученные результаты указывают на то, что взаимодействие вируса с моноцитами опухоли при введении повторной дозы является критичным для эффективности онколитической терапии. Предположительно, эффект второй дозы связан не с дополнительным инфицированием опухоли, а с изменением активности опухолевых лейкоцитов.

Работа выполнена при поддержке гранта НИТУ «МИСиС» № В100–Д46–2017/0052.

INTRAVITAL MICROSCOPY REVEALS NOVEL INTERACTIONS BETWEEN ONCOLYTIC VIRUSES AND INTRAVASCULAR LEUKOCYTES THAT ARE CRITICAL FOR DELIVERY, INFECTION AND T CELL RECRUITMENT

V. Naumenko^{1,2}, D. Mahoney², C. Jenne²

¹*National University of Science and Technology “MISIS”, Moscow, Russia;*

²*University of Calgary, Calgary, Canada*

Oncolytic virus (OV) immunotherapy is an approach to treating cancer in which replicating viruses are engineered to selectively infect and kill cancer cells while simultaneously inciting antitumour immunity. The ideal route of OV administration is intravenous, although delivering sufficient virus to the tumour parenchyma remains an unmet challenge. This is partly because the natural mechanisms whereby OVs travel from blood to cancer cell are unknown. To determine how OVs migrate across the tumour endothelium and gain access to the parenchyma, we developed a method to track virus particles in live mice using intravital microscopy. Within minutes of injecting VSV^{ΔM51} into virus-naïve CT-26 tumour-bearing mice, the virus was observed attaching to endothelial cells, tumor cells protruding into blood vessels and, most prominently, intravascular neutrophils. Shortly thereafter, virus-bound neutrophils were observed extravasating the endothelium and crawling within the tumor interstium. Ly6G depletion significantly delayed the infection of CT-26 tumours by VSV^{ΔM51}, indicating that neutrophils play a key role in delivering virus to tumor cells *in vivo*. Interestingly, a subsequent dose of VSV^{ΔM51} administered 24–72h later was observed binding to intravascular monocytes expressing CD11b, F4/80, and CD169. Those VSV^{ΔM51}-bound monocytes in turn seeded intravascular agglomerates with neutrophils. Surprisingly, while two doses of VSV^{ΔM51} controlled CT-26 tumour growth more effectively than one dose, the second dose never infected CT-26 cancer cells. However, it did prolong the infection of the first dose and promote the recruitment of CD8+ T cells. These phenomena were both dependent upon the formation of the intravascular agglomerates. Our results indicate that virus-leukocyte interactions within tumour vessels govern multiple aspects of the oncolytic virus effect *in vivo*.

Keywords: oncolytic virus, cancer immunotherapy.

Поступили 15.08.2017

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ СРЕДСТВАМ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *P. AERUGINOSA* НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

В.В. Пугач, А.А. Аноп, Ю.А. Шишпорёнок, В.А. Горбунов, Л.П. Титов
ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь

Резюме. В настоящей работе представлены результаты определения механизмов резистентности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивых к карбапенемам, на основании анализа профиля их резистентности к антибиотикам. Показано, что фенотипические методы могут применяться для скрининговой детекции генетических детерминант резистентности микроорганизмов к антибиотикам, а также в качестве предварительного этапа в проведении молекулярно-генетических исследований антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотикорезистентность, профиль резистентности, генетические детерминанты, скрининг.

Введение. Одной из важнейших проблем современной медицины является проблема возникновения и широкого распространения устойчивости микроорганизмов к антимикробным средствам (АМС) [1]. Одним из наиболее широко распространенных возбудителей инфекционных заболеваний являются бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Эти микроорганизмы способны длительное время сохранять жизнеспособность в окружающей среде, обладают многочисленными факторами вирулентности, а также широким спектром механизмов резистентности к АМС, как фенотипических, так и генетически детерминированных [2]. Согласно данным научной литературы, уровни устойчивости синегнойной палочки к антибиотикам, применяемым для лечения обусловленных ею инфекций, достаточно высоки. При этом отмечаются рост количества высокорезистентных штаммов и их все более широкое распространение, в том числе за счет горизонтального переноса генов резистентности к АМС [3]. В совокупности, значительные способности к адаптации к условиям окружающей среды и высокие уровни резистентности к АМС определяют вопросы изучения механизмов резистентности *P. aeruginosa* как одни из наиболее актуальных, в том числе для практического здравоохранения.

Одной из групп методов, позволяющих выявить наличие того или иного генетически детерминированного механизма резистентности *P. aeruginosa* к АМС, являются молекулярно-генетические методы. Они обладают высокой чувствительностью и специфичностью, однако достаточно трудоемки и затратны, требуют наличия дополнительного дорогостоящего оборудования. Одним из альтернативных подходов к выявлению генетических детерминант резистентности может служить анализ фенотипических характеристик микроорганизмов. Так, существуют коммерческие наборы для выявления того или иного механизма резистентности микроорганизмов к АМС диско-диффузионным методом. Этот метод существенно дешевле, нетрудоемок, быстр, не требует наличия дополнительного оборудования и обладает достаточно высокими чувствительностью и специфичностью.

Цель исследования — определить наличие генетических детерминант резистентности к антибиотикам у клинических штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов учреждений здравоохранения Республики Беларусь, посредством анализа их профиля резистентности к антибактериальным средствам.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 65 антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов учреждений здравоохранения Республики Беларусь. Идентификация микроорганизмов проводилась бактериологическим методом с применением дополнительных биохимических тестов (оксидазный тест). Профиль резистентности к антибиотикам определялся при помощи автоматического бактериального анализатора Vitek 2 Compact (Biomerieux, Франция). Определение механизмов устойчивости к антибиотикам у штаммов *P. aeruginosa*, устойчивым к карбапенемам (в частности, меропенему), осуществлялось при помощи коммерческого набора «KPC&MBL&OXA-48 disc kit» (Liofilchem, Италия) в соответствии с критериями EUCAST.

Результаты исследования. В результате проведенного исследования установлено, что из 65 штаммов *P. aeruginosa* чувствительными к меропенему оказались 37 штаммов (56,92 %), что явилось поводом к исключению этих штаммов из исследования. Таким образом, определение механизмов резистентности проводилось у 28 штаммов *P. aeruginosa*. Среди исследованных штаммов у 11 (39,29±9,4 %) механизм резистентности к антибиотикам был определен как OXA-48 (OXA-48-положительные штаммы), а у 2 штаммов (7,14±4,96 %) была выявлена продукция карбапенемазы *Klebsiella pneumoniae* (KPC-положительные штаммы). Остальные 15 штаммов (53,57±9,6 %) были идентифицированы как продуценты бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL-положительные штаммы).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о широкой распространенности ESBL-положительных и OXA-48-положительных штаммов в популяции карбапенем-резистентных *P. aeruginosa*, циркулирующих на территории Республики Беларусь, что может обусловить возникновение затруднений в назначении рациональной этиотропной терапии при синегнойной инфекции за счет существенного сужения спектра возможных к применению АМС. Наличие в популяции *P. aeruginosa* штаммов, продуцирующих *K. pneumoniae*-карбапенемазы, является тревожащим обстоятельством ввиду возможности более широкого распространения этого механизма резистентности к АМС среди микроорганизмов, циркулирующих на территории Республики Беларусь, в том числе нозокомиальных штаммов. Для получения более достоверных данных о механизмах резистентности *P. aeruginosa* к АМС необходимо проведение исследования на большем количестве штаммов с параллельным применением нескольких методов. Несмотря на это, по результатам проведенного исследования можно заключить, что диско-диффузионный метод может применяться для скринингового определения наличия того или иного механизма резистентности в целевой популяции микроорганизмов и рутинно применяться микробиологическими лабораториями в практическом здравоохранении.

Литература

1. Antibiotic resistance: fact sheet [Electronic resource]. — Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. — Date of access: 13.09.2017.
2. *Pseudomonas aeruginosa* infections [Electronic resource]. — Mode of access: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>. — Date of access: 13.09.2017.
3. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium / N. Mesaros [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2007. — Vol. 13, No. 6. — P. 560–578.

**DETECTION OF GENETIC DETERMINANTS OF RESISTANCE
TO ANTIBIOTICS
IN CLINICAL STRAINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ON THE BASIS
OF ANALYSIS OF THEIR PHENOTYPIC CHARACTERISTICS**

V.V. Pugach, A.A. Anop, J.A. Shishporenok, V.A. Gorbunov, L.P. Titov
Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

The results of determination of resistance mechanisms, based on analysis of the antibiotic resistance profile of carbapenem-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, are presented. Phenotypic methods can be used as screening tests for rapid identification of genetic determinants of microorganisms' resistance to antibiotics, as well as be carried out as a preliminary stage in molecular genetic research of resistant to antibiotics strains of microorganisms.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, resistance profile, genetic determinants, screening.

Поступили 25.09.2017

**УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ
SERRATIA MARCESCENS, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

В.В. Пугач, А.А. Аноп, Ю.А. Шишпорёнок, В.А. Горбунов, Л.П. Титов
*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь*

Резюме. *Serratia marcescens* относится к группе редко встречающихся грамотрицательных бактерий (РВ ГОБ), роль которых в инфекционной патологии человека длительное время была недооценена. Нами показано, что этот микроорганизм обладает высокими уровнями резистентности к антибиотикам (АБ), что, в совокупности со способностью в широких пределах адаптироваться к условиям окружающей среды, обуславливает необходимость проведения более тщательного контроля за распространением этого микроорганизма и мониторинга уровней его чувствительности к АБ.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, антибиотикорезистентность, редко встречающиеся грамотрицательные бактерии, нозокомиальные инфекции.

Введение. Одной из наиболее значимых в инфекционной патологии человека групп микроорганизмов являются грамотрицательные бактерии (ГОБ), одной из которых является *Serratia marcescens*. На сегодняшний день, *S. marcescens* считается оппортунистическим микроорганизмом, способным обуславливать патологические процессы различной локализации. Несмотря на относительно низкий удельный вес *Serratia spp.* в структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), эти микроорганизмы могут обуславливать внутрибольничные вспышки, особенно в отделениях интенсивной терапии и реанимации (ОИТР). При этом, особую опасность *S. marcescens* представляют для иммунокомпрометированных лиц, а также новорожденных и детей младшего возраста. *S. marcescens* обладает природной

устойчивостью к ряду АБ, а также выраженной способностью к формированию резистентности к АБ [1].

Цель исследования — на основании анализа данных, представленных в базе WHONET, дать характеристику устойчивости к АБ клинических штаммов *S. marcescens*, выделенных от пациентов в Республике Беларусь в 2011–2016 гг.

Материалы и методы. Проведен анализ данных об антибиотикорезистентности клинических штаммов *S. marcescens* (n=570), представленных в базе WHONET, за 2011–2016 гг.

Результаты исследования. Анализ уровней устойчивости штаммов *S. marcescens* к АБ пенициллинового ряда выявил наличие выраженной устойчивости к аминопенициллинам и их комбинациям с ингибиторами β-лактамаз (устойчивы к ампициллину — 94,4 % (87,8–97,7 %, ДИ 95 %, n=108), амоксициллину/клавуланату — 84,6 % (79,6–88,6 %, ДИ 95 %, n=266), ампициллину/сульбактаму — 73,8 % (62,6–82,7 %, ДИ 95 %, n=80)). Устойчивость к пиперациллину была выявлена у 49,8 % (44,0–55,6 %, ДИ 95 %, n=299) исследованных штаммов. При применении комбинации уреидопенициллинов с ингибиторами β-лактамаз (пиперациллин/тазобактам), эффективность последних существенно возрастала (устойчивы 15,7 % (11,3–21,4 %, ДИ 95 %, n=216)). Устойчивость к цефазолину была выявлена у 93,9 % (87,4–97,3 %, ДИ 95 %, n=114), к цефуроксиму — у 89,9 % (85,6–93,1 %, ДИ 95 %, n=278) исследованных штаммов. К цефокситину устойчивыми оказались 53,8 % (44,9–62,5 %, ДИ 95 %, n=130) исследованных штаммов. 44,4 % (38,5–50,5 %, ДИ 95 %, n=275) исследованных штаммов *S. marcescens* были устойчивы к цефотаксиму, 26,4 % (22,4–30,8 %, ДИ 95 %, n=440) — к цефтазидиму, 42,1 % (34,8–49,7 %, ДИ 95 %, n=178) — к цефтриаксону. У 29,4 % (25–34,3 %, ДИ 95 %, n=388) наблюдалась устойчивость к цефепиму. Среди фторхинолонов наиболее эффективными в отношении *S. marcescens* оказались норфлоксацин и левофлоксацин — устойчивыми к ним оказались 10,8 % (6,7–16,8 %, ДИ 95 %, n=167) и 16,2 % (11,5–22,3 %, ДИ 95 %, n=197) штаммов, соответственно. Резистентность к офлоксацину и моксифлоксацину была выявлена у 29,4 % (20,3–40,4 %, ДИ 95 %, n=85) и 28,4 % (18,4–40,9 %, ДИ 95 %, n=67) исследованных штаммов, соответственно. Устойчивость к АБ карбапенемового ряда — эртапенему, имипенему и меропенему — была относительно низкой и составила 9,8 % (3,2–24,1 %, ДИ 95 %, n=41), 13,2 % (10–17,3 %, ДИ 95 %, n=356) и 12,8 % (9,6–16,8 %, ДИ 95 %, n=366), соответственно. К аминогликозидам — амикацину, гентамицину и тобрамицину — были устойчивы около трети исследованных штаммов (27,3 %, 23–32,1 % ДИ 95 %, n=385; 32,5 %, 28,2–37,1 %, ДИ 95 %, n=437 и 34,9 %, 29,9–40,3 %, ДИ 95 %, n=338, соответственно). Триметоприм/сульфаметоксазол был неэффективен в отношении 38,6 % (33,5–44 %, ДИ 95 %, n=345), а более 86 % (78,1–91,6 %, ДИ 95 %, n=115) исследованных штаммов были устойчивы к колистину. Устойчивость к азтреонаму выявлена у 49 % (39–59 %, ДИ 95 %, n=102) исследованных штаммов, более четверти были устойчивы к хлорамфениколу (26,3 %, 18–36,5 %, ДИ 95 %, n=95), а к тетрациклину и миноциклину были устойчивы 47,4 % (40,5–54,4 %, ДИ 95 %, n=211) и 22,2 % (13,6–33,8 %, ДИ 95 %, n=72) штаммов, соответственно.

Выводы. РВ ГОБ *S. marcescens* являются одним из значимых патологических агентов в этиологической структуре различных нозологических форм инфекционного процесса. Анализ уровней чувствительности к АБ штаммов *S. marcescens* показал их относительно высокую чувствительность к карбапенемам и фторхинолонам. В то же время, *S. marcescens* демонстрируют высокие уровни резистентности к цефалоспорином I и II поколений, что коррелирует с общемировыми данными. Уровни резистентности выявленных штаммов к цефалоспорином III и IV поколений (от 26,4 % до 44,4 % исследованных изолятов) позволяют предположить широкое

распространение в популяции циркулирующих в республике *S. marcescens* продуцентов цефтазидим-гидролизующих β -лактамаз расширенного спектра и β -лактамаз класса C. Наиболее эффективными пенициллиновыми препаратами являются защищенные уреидопенициллины, однако и к этой группе антибиотиков исследованные штаммы *S. marcescens* демонстрируют достаточно высокую резистентность (15,7 %). Устойчивость примерно трети исследованных штаммов к аминогликозидам, триметоприму/сульфометоксазолу, более четверти — к миноциклину и хлорамфениколу, около половины — к тетрациклину и азтреонаму, а более 86 % — к колистину в значительной степени ограничивает возможности выбора адекватной тактики назначения антимикробной терапии. С учетом того, что одной из групп с наиболее высоким риском развития инфекционной патологии, обусловленной *S. marcescens*, являются пациенты ОИТР, а также высокой устойчивости этого микроорганизма в окружающей среде (почва, поверхности антропогенных объектов, вода), широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов этого микроорганизма способно обусловить значительное увеличение прямого и косвенного медицинского, социального и экономического ущерба.

Литература

1. Stock, I. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii* / I. Stock, T. Grueger, B. Wiedemann // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2003. — Vol. 22, No. 1. — P. 35–47.

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF *SERRATIA MARCESCENS* CLINICAL STRAINS, IDENTIFIED ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

V.V. Pugach, A.A. Anop, J.A. Shishporenok, V.A. Gorbunov, L.P. Titov
Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

Serratia marcescens belongs to a group of rare Gram-negative bacteria, whose role in human pathology has been underestimated for a long period of time. However, this microorganism possesses high levels of resistance to antibiotics, which, taking into account its ability to easily adapt to various environments, determines the necessity of carrying out more thorough control of spreading of this microorganism, as well as to monitor its antibiotic resistance levels.

Keywords: *Serratia marcescens*, antibiotic resistance, rare Gram-negative bacteria, Nosocomial infections.

Поступили 25.09.2017

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПОЛИО- И НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПРОТЕКАЮЩИХ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА У ДЕТЕЙ

*Е.О. Самойлович¹, Е.Ю. Свирчевская¹, И.Ф. Ухова¹, Л.И. Ясинская²,
М.А. Ермолович¹, Г.В. Семейко¹*

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

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Резюме. Целью данной работы являлся анализ результатов эпидемиологического надзора за заболеваниями с синдромом ОВП (ОВП) в Республике Беларусь за многолетний период (1996–2016 гг.). За этот период было выявлено 985 случаев ОВП. Средний показатель выявления ОВП в год составил 3,0 на 100 000 детей до 15 лет. В результате проведенного исследования двух образцов стула от каждого случая ОВП у 51 (5,2 %) ребенка были выявлены полиовирусы (ПВ), у 52 (5,3 %) — неполиомиелитные кишечные вирусы. Результаты серологической и молекулярной идентификации показали, что все ПВ являлись вакцинными. В 12 случаях они явились этиологическим агентом заболевания — вакциноассоциированного полиомиелита. Неполиомиелитные вирусы, выделенные от детей с синдромом ОВП, были представлены вирусами Коксаки (В1, В2, В4, В5), вирусами Экхо (Экхо 6, Экхо 7, Экхо 11, Экхо 24, Экхо 25), аденовирусами.

Ключевые слова: острый вялый паралич, полиовирус, неполиомиелитные кишечные вирусы.

Введение. Заболевания, протекающие с синдромом острого вялого паралича (ОВП) у детей, рассматриваются как подозрительные на полиомиелит, и в соответствии с рекомендациями ВОЗ надзор за ними составляет основу надзора за полиомиелитом [1] в Республике Беларусь надзор за ОВП у детей до 15 лет ведется с 1996 г.

Целью данной работы являлся анализ результатов надзора за ОВП в Республике Беларусь за многолетний период (1996–2016 гг.).

Материалы и методы. В течение 1996–2016 гг. в Национальном референс-центре по полиомиелиту (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) проведено вирусологическое обследование 985 детей с синдромом ОВП из всех регионов Республики Беларусь. Обследование проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ для национальных лабораторий по полиомиелиту [2]. От каждого ребенка исследовано по 2 пробы стула. Выделение вирусов осуществляли с использованием культур клеток RD, L20D, Her2C. Идентификацию вирусных изолятов осуществляли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к полиовирусам 1, 2 и 3 типов (ПВ1, ПВ2 и ПВ3, соответственно) производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (Россия) или Института общественного здоровья (Билтховен, Нидерланды). Изоляты, в которых ПВ не определялся, были исследованы в реакции нейтрализации с использованием набора типоспецифических сывороток к энтеровирусам (производства Института общественного здоровья, Билтховен, Нидерланды). Вирусы, которые давали типичный для аденовирусов цитопатический эффект в культуре клеток (морфологически круглые клетки), исследовали с применением коммерческой диагностической ПЦР тест-системы «АмплиСенс Adenovirus-Eph» (Россия). Внутритиповую дифференциацию полиовирусов (определение диких и вакцинных штаммов) выполняли на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов области генома, кодирующей структурный белок VP1 [3].

Результаты и обсуждение. В течение 1996–2016 гг. в Республике Беларусь было выявлено 985 случаев ОВП. Во все годы надзор соответствовал критериям, предъявляемым ВОЗ. Среднее число выявленных случаев ОВП в год составило 46,9 (колебалось от 28 в 1996 г. до 71 случая в 2016 г.). Средний показатель выявления ОВП в год составил 3,0 на 100 000 детей до 15 лет (рекомендованный ВОЗ показатель — не менее 1 [1]). Все дети вирусологически обследованы, из них 885 (89,8 %) — в первые 14 дней от начала паралича (критерий ВОЗ — не менее 80 %). Кишечные вирусы изолированы в культуре клеток от 103 (10,5 %) из них. Проведенная идентификация выделенных вирусов с использованием серологических и молекулярных методов позволила установить, что 51 (5,2 %) ребенок экскретировал ПВ, 52 ребенка — неполиомиелитные кишечные вирусы.

Установлено, что все изолированные ПВ имели вакцинное происхождение. В 12 случаях вакцинный ПВ являлся этиологическим агентом заболевания — вакциноассоциированного полиомиелита (ВАПП). В оставшихся 39 случаях ОВП выделение вакцинного ПВ было обусловлено недавней вакцинацией с использованием живой оральной полиомиелитной вакцины, совпавшей по времени с развитием паралича, вызванного другой причиной (постинъекционная нейропатия, синдром Гийенна-Барре и др.). Одиннадцать из 12 случаев ВАПП были выявлены в 1996–2001 гг. при применении для иммунизации против полиомиелита оральной полиовакцины. Единственный случай ВАПП, возникший позднее в 2007 г., был выявлен при использовании комбинированной схемы иммунизации (три дозы инактивированной вакцины сопровождающиеся назначением трех доз оральной вакцины), имел место у ребенка с первичным В-клеточным иммунодефицитом.

Неполиомиелитные вирусы, выделенные от детей с синдромом ОВП, были представлены вирусами Коксаки (В1, В2, В4, В5), вирусами Экхо (Экхо 6, Экхо 7, Экхо 11, Экхо 24, Экхо 25), аденовирусами. Роль неполиомиелитных вирусов в этиологии ОВП была наиболее убедительно доказана в нескольких случаях — полиомиелитоподобное заболевание, обусловленное вирусом Коксаки В4 (1996 г.), энцефаломиелит с нижним парапарезом, обусловленный вирусом Экхо 25 (2001), полинейропатия с нижним вялым парапарезом, обусловленная вирусом Коксаки В5 (2012 г.), острый правосторонний плечевой плексит, обусловленный вирусом Коксаки В2 (2016 г.).

Заключение. Вирусологическое обследование детей с синдромом ОВП является чрезвычайно важным для своевременного выявления случаев полиомиелита, вызванных диким ПВ, и недопущения дальнейшего распространения вируса. Качественно проводимый надзор за этими заболеваниями позволяет не пропустить случаи вакциноассоциированного полиомиелита. Результаты вирусологического обследования в комплексе с клинико-эпидемиологическими данными способствуют также и установлению этиологического диагноза, не связанного с полиомиелитными вирусами.

Литература

1. World Health Organization. Acute flaccid paralysis (AFP) surveillance: the surveillance strategy for poliomyelitis eradication // *Wkly Epidemiol. Rec.* — 1998. — Vol. 73. — P. 113–117.
2. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. – Женева : ВОЗ, 2005. – 112 с.
3. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay / J. Balanant [et al.] // *Virology.* — 1991. — Vol. 184. — P. 645–654.

ETIOLOGICAL ROLE OF POLIO- AND NON-POLIO ENTEROVIRUSES IN THE DEVELOPMENT OF DISEASES ASSOCIATED WITH SYNDROME OF ACUTE FLACCID PARALYSIS IN CHILDREN

*E.O. Samoilovich¹, E.Ju. Svirchevskaya¹, I.F. Uhova¹, L.I. Jasinskaya²,
M.A. Yermalovich¹, G.V. Semeiko¹*

¹Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The aim of this work was the analysis of the results of acute flaccid paralysis (AFP) surveillance in Belarus for the period of 1996–2016. For this period 985 AFP cases were reported. The average AFP detection rate per year was 3.0 per 100,000 children under 15 years of age. As a result of the investigations of two stool samples from each AFP case, polioviruses (PVs) were isolated from 51 (5.2 %) cases, non-polio enteric viruses — from 52 (5.3 %) cases. The results of serological and molecular identification showed that all PVs were vaccine. In 12 cases they were etiological agent of diseases — vaccine-associated paralytic poliomyelitis. Non-polioviruses isolated from AFP cases were represented by Coxsackie viruses (B1, B2, B4, B5), Echoviruses (Echo 6, Echo 7, Echo 11, Echo 24, Echo 25), adenoviruses.

Keywords: acute flaccid paralysis, polioviruses, non-polio enteric viruses

Поступили 25.09.2017

ДОСТИЖЕНИЯ В ЭЛИМИНАЦИИ КРАСНУХИ

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

Резюме. Выполненное в 2012–2017 гг. лабораторное обследование 2 043 подозрительных на краснуху пациентов позволило выявить 13 случаев краснухи (10 — в 2012 г. и по одному в 2013, 2014 и 2015 гг.). Многолетний показатель заболеваемости составил менее 1 случая на млн. населения. На основании эпидемиологических данных и результатов молекулярно-генетического изучения вирусов из 13 случаев краснухи к завозным были отнесены 4: 2 — в 2012 г. (из Китая и Таиланда), 1 — в 2014 г. (из Польши) и 1 — в 2015 г. (из Китая). Участок E1 гена был секвенирован для двух вирусов краснухи — завезенного из Польши и завезенного из Китая. В обоих случаях вирус принадлежал к генотипу 2В. Представленные данные свидетельствуют об успешном выполнении программы элиминации краснухи в Республике Беларусь.

Ключевые слова: краснуха, заболеваемость, элиминация.

Введение. Еще в недалеком прошлом краснуха относилась к достаточно распространенным инфекциям как в Республике Беларусь, так и в Европейском регионе в целом. Внедрение вакцинации против этой инфекции с использованием трехвалентной вакцины корь-паротит-краснуха (в Республике Беларусь — с 1996 г. однодозовая схема вакцинации, с 2000 г. — двухдозовая схема) существенно снизило заболеваемость, но еще в начале 2000-х гг. в Республике Беларусь ежегодно выявлялось несколько тысяч заболевших краснухой. В 2005–2006 гг. наряду с плановой вакцинацией детей 12 месяцев и 6 лет была проведена кампания дополнительной иммунизации девочек

и мальчиков в возрасте 11–19 лет моновалентной вакциной против краснухи, в рамках которой было привито более 1 млн. человек. Проведенные мероприятия координальным образом отразились на заболеваемости, и начиная с 2007 г. в Республике Беларусь регистрируются единичные случаи краснухи [1]. Надзор за этой инфекцией осуществляется в соответствии со стандартами ВОЗ, разработанными для выполнения программы элиминации кори и краснухи в Европейском регионе [2].

Целью настоящего исследования явился анализ результатов мониторинга краснушной инфекции в Республике Беларусь за 5–летний период.

Материалы и методы. В соответствии с рекомендациями ВОЗ все случаи, соответствующие стандартному определению случая кори и случая краснухи, были обследованы на наличие специфических IgM антител к обеим инфекциям. При необходимости также проводили исследование IgG антител в парных сыворотках крови. Антитела класса IgM и IgG к вирусам кори и краснухи определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства Siemens, Германия.

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 проводили с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия). ОТ-ПЦР для выявления РНК вируса краснухи выполняли согласно протоколу, представленному J.M. Huebschen с соавт. [4].

Результаты и обсуждение. В течение января 2012 — июля 2017 гг. в Республике Беларусь обследовано на краснуху 2 043 подозрительных пациентов, диагноз краснуха подтвержден у 13 человек (10 в 2012 г., по 1 — в 2013, 2014 и 2015 гг.). В 2016 г. и на протяжении 7 месяцев 2017 г. случаев краснухи выявлено не было.

Все 13 выявленных случаев краснухи были подтверждены лабораторно обнаружением специфических IgM антител. В 3-х случаях диагноз был также подтвержден обнаружением РНК вируса краснухи в ОТ-ПЦР. В 2-х из них удалось секвенировать участок E1 гена вируса краснухи. Для вируса краснухи, завезенного из Польши в 2014 г. секвенированная последовательность состояла из 530 нуклеотидов. Ее анализ показал, что данный вирус принадлежит к генотипу 2В. Поскольку секвенировать весь необходимый для генотипирования участок E1 гена (739 нуклеотидов), не удалось, это не позволило депонировать результаты изучения данного вируса в базу данных ВОЗ нуклеотидных последовательностей вирусов краснухи RubNS. Секвенирование участка E1 гена вируса краснухи (739 нуклеотидов), завезенного из Китая в 2015 г., показало, что данный вирус также относится к генотипу 2В. Нуклеотидная последовательность его депонирована в базу данных RubNS.

Таблица — Результаты лабораторного обследования на краснуху и классификация выявленных случаев заболевания.

Годы	Число обследованных пациентов	Число выявленных случаев	Классификация случаев
2012	368	10	2 — завозные (из Китая, Таиланда), 1 — связан с завозом, 7 — происхождение не установлено
2013	329	1	1 — происхождение не установлено
2014	423	1	1 — завозной (из Польши)
2015	350	1	1 — завозной (из Китая)
2016	399	0	-
2017 (7 мес.)	174	0	-

На основании эпидемиологических данных и результатов молекулярно-генетического изучения вирусов из 13 случаев краснухи к завозным были отнесены 4: 2 — в 2012 г. (из Китая, Таиланда), 1 — в 2014 г. (из Польши) и 1 — в 2015 г. (из Китая). Остальные 9 заболевших краснухой (8 — в 2012 г., 1 — в 2013 г.) в течение инкубационного периода из страны не выезжали. Происхождение этих случаев осталось не установленным.

Сравнивая данные надзора за краснухой в Республике Беларусь с данными по Европейскому региону в целом, следует отметить, что в 2016 г. в регионе зарегистрировано 1 326 случаев краснухи в 16 странах. Почти все случаи были зарегистрированы в Польше (n=1 144; 86 %), за ней следуют Германия (96; 7 %), Италия (29; 2 %), Румыния (13; 1 %) и Грузия (12; 1 %) [5]. Из общего числа зарегистрированных случаев только 53 (4 %) были подтверждены лабораторно (в Германии — 22, Румынии — 12, Италии — 5). Все зарегистрированные в Польше случаи были выявлены на основании клинических данных. В базу данных RubeNS в 2016 г. по Европейскому региону депонированы данные о секвенировании 11 вирусов краснухи. Выявлены генотипы 2В (n=8), 1G (1), 1Н (1) и 1Е (1). Сведения о происхождении инфекции были установлены для 9 % (n=113) случаев краснухи. Из них 6 были зарегистрированы как завозные, что составило 5,3 % случаев со сведениями о завозе инфекции. Завозные случаи были зарегистрированы в Испании (1), Соединенном Королевстве (n=1), Германии (2) и Хорватии (2) [5].

Заключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что в последние 5 лет заболеваемость краснухой в Республике Беларусь находится на уровне ≤ 1 случая на миллион населения, что соответствует критерию элиминации инфекции.

Литература

1. Самойлович, Е. О. Надзор за вакциноуправляемыми инфекциями в Республике Беларусь: соответствие международным стандартам / Е. О. Самойлович // Здравоохранение. — 2014. — № 6 — С. 7–11.
2. Элиминация кори и краснухи. Основы процесса верификации в Европейском регионе ВОЗ. — Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ, 2014. — 32 с.
3. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. — 2nd ed. — Geneva : WHO. — 2006. — 100 p.
4. Co-circulation of multiple rubella virus strains in Belarus forming novel genetic groups within clade 1 / J. M. Hübschen [et al.] // J. Gen. Virol. — 2007. — Vol. 88, No. 7. — P. 1960–1966.
5. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region. — WHO EpiBrief. — 2017. — № 1. — 12 p.

ACHIVMENTS IN RUBELLA ELIMINATION

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

Laboratory examination of 2,000 rubella-suspected patients completed in 2012–2017 years revealed 13 cases of rubella (10 in 2012 and one in 2013, 2014 and 2015). The multi-year incidence rate was less than 1 case per million population. Based on epidemiological data and the results of molecular genetic studies of the viruses, 4 out of 13 cases of rubella were attributed to imported ones: 2 cases — in 2012 (from China and Thailand), 1 — in 2014 (from Poland) and 1 — in 2015 (from China). Fragment of E1 gene was sequenced for two rubella viruses — imported from Poland and imported from China. In both cases, the virus

belonged to genotype 2B. The presented data demonstrates the successful implementation of the rubella elimination program in the Republic of Belarus.

Keywords: rubella, incidence, elimination.

Поступили 29.09.2017

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЭНДЕМИЧНАЯ ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ПАРОТИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ?

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

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

Резюме. Выполненное в течение 2013–2016 гг. с использованием серологических (IgM, IgG) и молекулярных (ОТ-ПЦР) методов лабораторное обследование 595 подозрительных на эпидемический паротит пациентов позволило выявить 19 случаев эпидемического паротита. Заболеваемость составила ≤ 1 случая на млн населения. Девять случаев эпидпаротита были выявлены у иностранных граждан и 10 — у граждан Республики Беларусь, из которых трое заболели после посещения других стран. Результаты генотипирования вирусов и эпидемиологические данные свидетельствуют о существовании множественных завозов вируса паротита на территорию Республики Беларусь (2013 г. — из Чехии (генотип G), 2014 г. — из Индии (генотип G), 2016 г. — из Китая (генотип F) и России, Чеченская Республика (генотип G)) и отсутствии циркуляции характерного для страны эндемичного варианта вируса.

Ключевые слова: эпидемический паротит, лабораторная диагностика. вирус паротита.

Введение. Внедрение вакцинации против эпидемического паротита (эпидпаротита) во многих странах мира способствовало снижению заболеваемости. В некоторых странах, в том числе и Республике Беларусь, показатель заболеваемости достиг уровня менее 1 на 100 000 населения (в Республике Беларусь — с 2010 г.) [1]. Вместе с тем, вспышки эпидпаротита, возникающие в разных странах, не являются редкостью и в настоящее время. В условиях низкой заболеваемости возрастает значимость лабораторной диагностики инфекции и молекулярно-генетического изучения возбудителя. Данные лабораторной диагностики и филогенетического анализа вируса позволяют установить истинную заболеваемость данной инфекцией и подтвердить либо исключить наличие эндемичной циркуляции вируса.

Целью данного исследования явился анализ данных лабораторного обследования подозрительных на эпидпаротит заболеваний, и молекулярно-генетическая характеристика вируса паротита, изолированного от заболевших.

Материалы и методы. В течение 2013–2016 гг. выявлено 595 подозрительных на эпидпаротит пациентов (т.е. пациентов с острым воспалением слюнных желез) в 7 регионах Республики Беларусь. Клинические образцы (сыворотка крови, моча, носоглоточный соскоб (НГС)) от этих пациентов были собраны и направлены на исследование в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Для лабораторной диагностики заболевания использовали: выявление сывороточных IgM антител к вирусу паротита в иммуноферментном анализе, обнаружения нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках крови в иммуноферментном анализе, детекции РНК вируса паротита в клинических образцах (НГС и моча) методом ОТ-ПЦР.

Положительный результат, полученный любым из методов, считался лабораторным подтверждением диагноза.

Определение IgM антител к вирусу паротита выполняли с использованием иммуноферментных тест-систем производства Virion\Serion (Германия) и Siemens (Германия), IgG антител — иммуноферментных тест-систем производства Virion\Serion (Германия). Вирусную РНК выделяли из мочи и НГС с помощью наборов QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и выявляли методом гнездовой ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к SH-гену согласно ранее описанному протоколу [2]. Полученные ПЦР продукты вырезали из геля и секвенировали с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе 3500 или Avant 3100 (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программ BioEdit и MEGA 6.0.

Результаты и обсуждение. Среди 595 подозрительных на эпидпаротит случаев, выявленных и лабораторно обследованных в течение 4 лет наблюдения (2013 г. — 188, 2014 г. — 160, 2015 г. — 127, 2016 г. — 120), диагноз эпидпаротита был лабораторно подтвержден одним или несколькими методами у 19 пациентов (5 — в 2013 г., 2 — в 2014 г., 1 — в 2015 г., 11 — в 2016 г.). Из них 9 случаев заболевания подтверждены на основании обнаружения специфических IgM антител, 2 — IgM антител и нарастания концентрации IgG антител, 7 — IgM антител и РНК вируса, 1 — РНК вируса.

Среди выявленных за 4 года 19 случаев эпидпаротита 9 выявлены у иностранных граждан, временно пребывающих на территории Республики Беларусь (Китай — 1, Туркменистан — 1, Россия (Республика Чечня) — 7). Три случая, зарегистрированные среди граждан Республики Беларусь, были выявлены после посещения ими во время инкубационного периода заболевания других стран и были классифицированы как завозные: из России (2013 г.), из Чехии (2013 г.), из Индии (2014 г.).

Выполненное секвенирование SH-гена вируса паротита от случаев заболевания, выявленных в Республике Беларусь, показало, что они были вызваны различными генотипами вируса либо различными вариантами одного генотипа. Так, случай эпидпаротита, развившийся в 2013 г. у ребенка 12 лет из г. Могилева после отдыха в Чехии был вызван вирусом паротита генотипа G. По данным литературы в 2013 г. в Чехии отмечалась крупная вспышка эпидемического паротита (зарегистрировано 1 553 случая заболевания), вызванная вирусом этого генотипа [3]. Генотипирование вируса от пациента 29 лет из г. Минска, заболевшего после посещения Индии (2014 г.), показало, что он также относится к генотипу G (в Индии отмечена коциркуляция генотипов G и C [4]), но обладает значительной долей различий (2,8 %, 9 замен) в сравнении с вирусом, завезенным из Чехии. Случай, выявленный в 2016 г. на территории Витебской области у гражданина Китая 25 лет, был вызван вирусом генотипа F. Выявленные в 2016 г. связанные между собой 7 случаев эпидпаротита у детей из Чеченской Республики, временно находящиеся с родителями на территории г. Бреста с целью выезда в Евросоюз, были вызваны вирусом генотипа G. Данный вариант вируса также отличался от вариантов генотипа G, завезенных в Республику Беларусь ранее из Чехии и из Индии. Многообразие генетических вариантов вируса на фоне низкой заболеваемости и отсутствие одного характерного для страны генетического варианта говорит в пользу отсутствия эндемичной циркуляции вируса на территории страны.

Восемь случаев эпидемического паротита у граждан Республики Беларусь (4 — в 2013 г., в том числе один из них по эпидемиологическим данным завозной из России, 1 — в 2014, 1 — в 2015, и 2 — в 2016 гг.) были подтверждены только серологическими методами, следовательно, определить генотип вируса не представлялось возможным.

Связанных между собой случаев заболевания среди граждан Республики Беларусь выявлено не было. Период времени между случаями составлял несколько месяцев. Эти данные также косвенно свидетельствуют об отсутствии эндемичной циркуляции вируса на территории страны. В то же время требуются дополнительные исследования, направленные на вирусологическое подтверждение каждого случая заболевания с последующей молекулярно-генетической характеристикой вируса, вызвавшего заболевание.

Заключение. Как свидетельствуют результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга эпидпаротита, заболеваемость этой инфекцией в Республике Беларусь в последние годы находится на очень низком уровне (≤ 1 случая на млн) и представлена редкими спорадическими случаями. В основном это случаи заболевания у иностранных граждан, временно пребывающих на территории Республики Беларусь, либо у белорусских граждан, заболевших после посещения других стран. У пациентов выявлены вирусы паротита, относящиеся к различным генетическим вариантам, что свидетельствует о множественных заносах вируса на территорию страны и отсутствии циркуляции характерного для страны эндемичного варианта вируса. Для дальнейшего контроля этой инфекции требуются дополнительные исследования по лабораторной верификации заболеваний слюнных желез, не связанных с вирусом паротита, а также вирусологическое подтверждение каждого выявленного случая эпидемического паротита.

Литература

1. Влияние вакцинации на популяционный иммунитет к вирусу паротита в Республике Беларусь / Е. О. Самойлович [и др.] // *Здравоохранение*. — 2012. — № 11. — С. 45–48.
2. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг эпидемического паротита в Республике Беларусь / В. П. Шиманович [и др.] // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр.* — Минск : ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — С. 107–113.
3. Mumps in the Czech Republic in 2013: clinical characteristics, mumps virus genotyping and epidemiological links / M. Havlockova [et al.] // *Centr. Eur. J. Public. Health*. — 2016. — Vol. 24, No. 1. — P. 22–28.
4. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes / L. Jin [et al.] // *Rev. Med. Virol.* — 2014. — Vol. 25, No. 2. — P. 85–101.

IS THERE AN ENDEMIC CIRCULATION OF MUMPS VIRUS IN THE REPUBLIC OF BELARUS?

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

Completed for the period from 2013 to 2016 laboratory examination of 595 suspicious mumps patients by using of serological (IgM, IgG) and molecular (RT-PCR) methods allowed to reveal 19 cases of mumps. The incidence was ≤ 1 cases per million population. Nine mumps cases among foreign citizens and 10 cases among citizens of the Republic of Belarus were detected, three of them became ill after visiting other countries. The results of virus genotyping and epidemiological data indicate the existence of multiple importations of the mumps virus into the Republic of Belarus (2013 — from the Czech Republic (genotype G), 2014 — from India (genotype G), 2016 — from China (genotype F) and Russia, the Chechen Republic (genotype G)) and the absence of circulation of the endemic variant of the mumps virus.

Keywords: mumps, laboratory diagnostics, mumps virus.

Поступили 29.09.2017

МОНИТОРИНГ ЦИРКУЛЯЦИИ ПОЛИОВИРУСОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В УСЛОВИЯХ ПЕРЕХОДА НА ИНАКТИВИРОВАННУЮ ПОЛИОВАКЦИНУ

Е.Ю. Свирчевская, М.А. Ермолович, И.Ф. Ухова, Е.О. Самойлович
ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь

Реферат. Переход на использование в Республике Беларусь для вакцинопрофилактики полиомиелита только инактивированной полиовакцины в апреле 2016 г. привел к резкому снижению циркуляции вакцинных полиовирусов (ПВ). По состоянию на 1 августа 2017 г. последний ПВ типа 1 был изолирован в августе 2016 г. из сточной воды, последний ПВ типа 2 — в апреле 2016 г. из сточной воды, последний ПВ3 — в сентябре 2016 г. от ребенка с ОВП, прибывшего из Российской Федерации и получившего там прививку бивалентной оральной полиовакциной. В настоящее время, надзор за циркуляцией ПВ имеет особую значимость, поскольку сохраняется риск заноса вакцинных, вакцинородственных и диких ПВ.

Ключевые слова: полиовирусы, инактивированная полиовакцина.

Введение. В мире достигнуты огромные успехи в глобальной ликвидации полиомиелита. С 1988 г. число случаев полиомиелита, вызванных дикими полиовирусами (ПВ) уменьшилось более чем на 99,0 % — с 350 000 до 37, зарегистрированных в 2016 г. [1]. Из трех серотипов ПВ (ПВ1, ПВ2 и ПВ3) в последние годы от заболевших выделяется только ПВ1. Дикий ПВ2 последний раз в мире был обнаружен в 1999 г., и в 2015 г. Глобальная комиссия ВОЗ по сертификации объявила о полной ликвидации этого серотипа ПВ. Последний случай полиомиелита, вызванный диким ПВ3, был зарегистрирован в 2012 г. Отсутствие выделения этого серотипа на протяжении ряда лет позволяет ожидать глобальной его ликвидации в ближайшем будущем.

Однако серьезной проблемой является существование так называемых вакцинородственных полиовирусов (ВРПВ), которые в значительной степени дивергировали от прототипных живых вакцинных штаммов и приобрели способность вызывать вспышки паралитического полиомиелита. В 2011–2015 гг. было зарегистрировано 230 случаев полиомиелита, вызванных ВРПВ, и 90 % из них были ассоциированы с ВРПВ типа 2 [2]. Для исключения таких случаев в апреле 2016 г. во всем мире было прекращено использование вакцинного ПВ2, и в настоящее время для профилактики полиомиелита используются трехвалентная инактивированная полиовакцина (ИПВ) и бивалентная живая оральная полиовакцина (БОПВ), содержащая вакцинные штаммы ПВ1 и ПВ3. В Беларуси в конце апреля 2016 г. осуществлен переход с комбинированной схемы иммунизации (3 дозы ИПВ + 3 дозы трехвалентной ОПВ) на 4-дозовую схему иммунизации с использованием ИПВ.

Учитывая складывающуюся в мире ситуацию по полиомиелиту, на современном этапе требуется усиление и совершенствование эпиднадзора за этой инфекцией. Наряду с выявлением и вирусологическим обследованием детей с синдромом острого вялого паралича (ОВП) проводится мониторинг циркуляции ПВ, который включает обследование различных групп детей (здоровых, больных ОКИ, ОРВИ, другими (не ОВП) заболеваниями нервной системы) и исследование сточных вод. Целью надзора за циркуляцией ПВ является своевременное выявление диких ПВ и ВДПВ, а также слежение за циркуляцией вакцинных ПВ. В надзоре за полиовирусной инфекцией в Беларуси участвуют Национальный референс-центр по полиомиелиту (НРЦП) и вирусологические лаборатории Минского городского ЦГЭ и областных ЦГЭиОЗ.

Все выделенные в любой из лабораторий цитопатогенные агенты (ЦПА) доставляются в РНЦП, где проводится их идентификация и дальнейшее молекулярно-генетическое изучение.

Целью настоящего исследования явился мониторинг циркуляции ПВ в условиях перехода на ИПВ.

Материалы и методы. При проведении надзора за заболеваниями с синдромом ОВП у детей до 15 лет в течение января 2015 — июня 2017 гг. вирусологически обследовано 165 пациентов (330 образцов стула) (62 пациента — в 2015 г., 71 — в 2016 г. и 32 — в январе-июле 2017 г.). За этот же период региональными лабораториями страны в РНЦП было доставлено 203 образца культуральной жидкости, содержащих ЦПА (101 — в 2015 г., 105 — 2016 г., 10 — 2017 г.).

Выделение полио- и неполиомиелитных вирусов проводили в культурах клеток Нер2С, RD, L20В. Серотипирование ПВ проводили в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ типов 1, 2 и 3, неполиомиелитных энтеровирусов (ЭВ) — с типоспецифическими сыворотками к ЭВ (производства ИПВЭ им. М.П.Чумакова, Россия). Молекулярную идентификацию неполиомиелитных ЭВ проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ методом одностадийной ОТ-ПЦР [3]. Идентификацию аденовирусов проводили методом ПЦР с использованием описанных в литературе праймеров [4]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле в трис-ацетатном буфере (рН 8,5). Генетическая характеристика ПВ получена на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов двух областей генома, кодирующих структурный белок VP1 и фрагмент вирусной полимеразы 3D1 с использованием анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генома [5].

Результаты и обсуждение. При исследовании проб стула от 165 детей с ОВП кишечные вирусы были изолированы от 10 детей, в том числе от двух детей — ПВ (ПВ2 и ПВ3), от одного — вирус Коксаки В2 и от 7 — аденовирусы. ПВ2 (два изолята) был выделен в 2015 г. от ребенка, привитого ОВП за 5 дней до заболевания. ПВ3 (два изолята) выделен в сентябре 2016 г., когда ОПВ в стране уже не применялась, от ребенка, проживающего в России и получившего там прививку БОПВ за 2 недели до приезда в Беларусь.

Серологическое типирование 203 ЦПА, выделенных региональными вирусологическими лабораториями при надзоре за полиомиелитом, показало, что в 62 (30,5 %) из них содержались ПВ. В 51 образце присутствовали моноциты ПВ, в 11 — смеси различных типов, после разделения которых всего было получено 75 изолятов ПВ, в том числе: ПВ1 — 21, ПВ2 — 29 и ПВ3 — 25. ПВ были изолированы из всех исследованных источников, включая 19 изолятов из сточной воды, 14 — от детей с ОКИ, 13 — от детей с ОРИ, 2 — от детей с другими диагнозами и 27 — от здоровых детей. Из этих изолятов 53 были получены в 2015 г. и 22 в 2016 г. Молекулярно-генетическое исследование показало, что все ПВ являлись вакцинными.

Остальные 141 образец ЦПА содержали неполиомиелитные кишечные вирусы, из которых 48 были получены в 2015 г., 83 — в 2016 г. и 10 в январе-июне 2017 г. В 2015 г. неполио-ЭВ составили 41,6 %, аденовирусы — 50,0 % изолятов, в 2016 г. их доля была соответственно 32,5 % и 61,4 %. В начале 2017 г. наблюдалась сходная ситуация, из 10 изолятов 5 являлись неполио-ЭВ и 5 — аденовирусами.

Переход с 26 апреля 2016 г. в Беларуси на применение только ИПВ привел к уменьшению выделения ПВ из всех источников. Общее количество ПВ, выделенных в 2016 г., было в 2,3 раза меньше в сравнении с 2015 г. (24 изолята в 2016 г. против 55 в 2015 г.). В течение января-июня 2017 г. ни одного ПВ изолировано не было. По состоянию на 1 августа 2017 г. последний ПВ1 в стране был изолирован в августе

2016 г. из сточной воды в Гомельской области, последний ПВ2 — в апреле 2016 г. из сточной воды в Гомельской области, последний ПВ3 — в сентябре 2016 г. от ребенка с ОВП. Таким образом, ПВ1 и ПВ3 были обнаружены через 4–5 месяцев после прекращения использования в стране живых вакцинных вирусов в составе ОПВ.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют о существенном снижении циркуляции ПВ в Беларуси после прекращения использования ОПВ, однако риск заноса как вакцинных ПВ, так и ВРПВ и диких ПВ будет сохраняться до тех пор, пока они не ликвидированы в глобальном масштабе. Наблюдения в течение 1 года не выявили возрастания циркуляции неполиомиелитных ЭВ на фоне снижения циркуляции ПВ, однако для того, чтобы делать окончательное заключение, эти исследования должны быть продолжены.

Литература

1. Полиомиелит. Информационный бюллетень ВОЗ, апрель 2017 г. [Electronic resource]. — Режим доступа : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/ru/>. — Дата доступа : 25.08.2017.
2. Заявление седьмого совещания Комитета ММСП по чрезвычайной ситуации в отношении международного распространения полиовируса. Заявление ВОЗ, 3 декабря 2015 г. [Electronic resource]. — Режим доступа : <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2015/ihr-ec-poliovirus/ru/>. — Дата доступа : 25.08.2017.
3. Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами для поддержки программы ликвидации полиомиелита. — Женева, 2005. — 27 с.
4. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR / A. H. Kidd [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1996. — Vol. 34, No. 3. — P. 622–627.
5. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay / J. Balanant [et al.] // Virology. — 1991. — Vol. 184. — P. 645–654.

MONITORING OF POLIOVIRUS CIRCULATION IN THE REPUBLIC OF BELARUS IN THE CONDITIONS OF TRANSITION TO THE INACTIVATED POLYOVACCINE

E.Y. Svirchevskaya, M.A. Yermalovich, I.F. Uhova, E.O. Samoilovich

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

The transition to the inactivated poliovaccine in the Republic of Belarus in April of 2016 has led to a sharp decline in the circulation of vaccine polioviruses (PV). As of August 1, 2017, the last PV of type 1 was isolated in August 2016 from sewage, the last PV of type 2 — in April 2016 of the year from sewage, the last PV3 — in September 2016 from a child with AFP, who arrived from the Russian Federation and was vaccinated there with bivalent oral poliovaccine. At the present time monitoring of PV circulation is extremely important, cause of since the risk of introduction of vaccine, vaccine-derived and wild PV is still present.

Keywords: poliovirus, inactivated polio vaccine.

Поступила 25.08.2017

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТСУТСТВИЯ ЭНДЕМИЧНОЙ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА КОРИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

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

Резюме. Представлен анализ данных по эпидемиологическому надзору за корью в Республике Беларусь за период 2016–2017 (8 мес.) гг. На основании результатов выявления и лабораторного обследования подозрительных на корь пациентов, а также молекулярно-генетического изучения вирусов показаны доказательства отсутствия эндемичной циркуляции вируса кори в стране в течение исследуемого периода.

Ключевые слова: корь, лабораторная диагностика, генотипирование.

Введение. Согласно прогнозам ВОЗ, наиболее ранний срок элиминации кори в Европейском регионе — 2020 г. Для достижения этой цели всем странам региона рекомендовано усилить эпидемиологический надзор с ежегодным представлением национальных данных, включая генетическую характеристику вируса от каждой цепочки их передачи, в Европейскую региональную комиссию по верификации элиминации кори и краснухи. Особое внимание при этом уделяется своевременности проведения генотипирования вирусов, выявленных у пациентов, и представления полученных данных по нуклеотидным последовательностям вируса кори в международную базу данных MeaNS. Сравнение нуклеотидного состава выявленных в Беларуси вирусов с вирусами, представленными в международной базе данных, позволяет изучить пути трансмиссии и определить, является ли вирус завозным или имеет местное происхождение.

Целью данного исследования является анализ данных лабораторного обследования подозрительных на корь, и молекулярно-генетическая характеристика вирусов кори, выявленных у заболевших в 2016–2017 (8 мес.) гг.

Материалы и методы. Основным методом исследования было выявление IgM антител к вирусу кори в ИФА. При сомнительном результате исследования IgM антител, проводилось выявление нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках и обнаружение РНК вируса в клиническом материале (носоглоточный мазок, моча) в ОТ-ПЦР.

Антитела классов IgM и IgG к вирусу кори определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства Siemens, Германия. Идентификацию вируса кори проводили в гнездовой ОТ-ПЦР, описанной J.R. Kremer и соавт. Генотипирование осуществляли с помощью секвенирования С-терминальной области N-гена (450 нуклеотидов).

Результаты и обсуждение. В течение анализируемого периода времени (январь 2016 — август 2017 гг.) в стране было лабораторно обследовано 622 пациента с подозрением на корь (427 — в 2016 г., 195 — в 2017 (8 мес.) г. На основании результатов лабораторных исследований подтверждено 29 случаев кори (28 — в 2016 г., 1 — в 2017 г.). В остальных случаях, которые рассматривались как подозрительные на корь, диагноз был исключен.

На протяжении 2016–2017 (8 мес.) гг. наблюдения в стране выявлена одна длительная цепочка передачи вируса кори и 3 не связанных между собой единичных случая без распространения.

Первый единичный случай кори был выявлен в феврале 2016 г. у пациентки 41 года, которая на протяжении всего инкубационного периода инфекции из города

не выезжала. Секвенирование N-гена вируса показало, что он относится к генотипу H1 и кластеризуется с вирусом генетического варианта Shandong, который в настоящее время имеет очень широкое распространение в Китае и Монголии, а также ассоциирован со случаями импортации в Японию, Корею, Российскую Федерацию. Ранее вирусы генотипа H1 в Республике Беларусь не выявлялись.

Второй единичный случай кори был выявлен в августе 2016 г. у пациентки 29 лет, находящейся в отпуске по уходу за ребенком, которая во время инкубационного периода из г. Минска не выезжала, контакт с заболевшими с сыпью отрицает. Секвенирование N-гена вируса показало, что он относится к генотипу D8, Cambridge. Данный геновариант был впервые выявлен в феврале 2016 г. в восточной Англии, и в дальнейшем вирус нашел широкое распространение по всей стране. Регистрировались случаи его импортации в Италию, Украину. Ранее вирус данного генетического варианта в Республике Беларусь также не выявлялся.

Распространения вируса кори от этих случаев не произошло. На основании эпидемиологических данных и результатов исследования вируса вышеописанные случаи классифицированы как связанные с завозным вирусом.

Третий единичный случай кори был выявлен в марте 2017 г. в г. Минске у пациента 34 лет после возвращения из Индии, где он находился на отдыхе в течение 10 дней. Генотипирование вируса показало, что он относится к генотипу D8, который в настоящее время имеет широкое распространение в Индии, однако не принадлежит ни к одному известному геноварианту. Наиболее близкородственным ему штаммом является вирус кори генотипа D8, Frankfurt (различия составляют 0,4 %). Распространения вируса кори от данного случая не произошло, случай классифицирован как завозной.

Связанные между собой случаи кори начали регистрироваться в июле 2016 г. среди иностранных граждан, временно находящихся на территории г. Бреста с целью пересечения Государственной границы Республики Беларусь в Республику Польша для получения статуса беженца за рубежом. Всего был зарегистрирован 131 случай кори, из них 123 случая — среди международных мигрантов (граждане Российской Федерации (Республика Чечня, Республика Дагестан), Республики Таджикистан, Кыргызстан, Грузии, Армении) и 8 случаев — среди граждан Республики Беларусь. Лабораторно подтверждены были 26 случаев, остальные классифицированы как эпидемиологически связанные с лабораторно-подтвержденными случаями. Проведенное секвенирование фрагмента генома 7 вирусов кори (5 — от иностранных граждан, 2 — от граждан Республики Беларусь) показало, что все они относились к генотипу D8, Frankfurt и являлись идентичными между собой.

Заключение. Несмотря на неоднократные завозы вируса кори на территорию Республики Беларусь и возникновение в 2016 г. вспышки кори среди мигрантов, проезжающих транзитом через Республику Беларусь в Европейский Союз, широкого распространения кори не произошло. Среди жителей Республики Беларусь период 2016–2017 (8 мес.) гг. было выявлено 11 случаев кори, вызванных вирусами 4 различных генотипов — H1, Shandong (1 случай), D8, Cambridge (1 случай), D8 (1 случай), и D8, Frankfurt (8 случаев). Вспышка среди мигрантов была вызвана вирусом D8, Frankfurt. Циркуляция вирусов D8, Frankfurt в приграничном Бресте продолжалась 5 месяцев, восстановления эндемичной передачи вируса не произошло.

MOLECULAR-GENETIC BASE FOR THE ABSENCE OF THE ENDEMIC CIRCULATION OF MEASLES VIRUS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

G.V. Semeiko, E.O. Samoilovich, M.A. Yermalovich, E.Y. Svirchevskaya

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

Analysis of the data on measles surveillance in the Republic of Belarus for the period of 2016–2017 (8 months) was presented. Based on the results of laboratory diagnosis of suspected measles patients, as well as the molecular-genetic study of viruses, evidence of the absence of endemic circulation of measles virus in the country during the study period was shown.

Keywords: measles, laboratory diagnosis, genotyping.

Поступили 25.09.2017

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АДЕНОВИРУСОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Т.А. Тимошичева¹, И.В. Амосова¹, Ж.В. Бузицкая¹, Н.И. Львов²

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства Обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: микрокультуральный иммуноферментный анализ, аденовирус, человек, выделение, культура клеток.

Введение. По данным ВОЗ ежегодно в мире острые респираторные заболевания (ОРЗ) переносит до 500 млн. человек. В РФ регистрируется около 50 млн. случаев инфекционных заболеваний, до 90 % которых приходится на грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) [1]. Аденовирусы (АВ) широко циркулируют по всему миру среди людей всех возрастов, особенно среди детей и молодых людей призывного возраста, у которых доля АВ в общей структуре ОРВИ может достигать 30 % и 64,6 % соответственно [2, 3]. Многообразие клинических проявлений АВ инфекции требует создания современных методов быстрой этиологической диагностики. В диагностической практике используют идентификацию вируса в нативном материале, а также методы обнаружения ДНК и специфических вирусных антигенов — полимеразная цепная реакция (ПЦР), метод иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ (ИФА) [4]. Выделение АВ в культуре клеток относится к методам «золотого стандарта», однако используется только при эпидемиологических расследованиях в специализированных вирусологических лабораториях. Метод выделения вируса в культуре клеток является длительным (до 3 недель), дорогостоящим и трудоемким, оценка результатов носит субъективный характер. При этом выделить АВ в культуре клеток удается примерно в половине случаев относительно данных ПЦР [3].

Цель работы: изучение возможностей использования метода микрокультурального ИФА (МИФА) для выделения АВ от людей.

Материалы и методы. Исследованы 68 назофарингеальных мазков от больных, госпитализированных с симптомами ОРВИ в военно-медицинские организации МО РФ в период с сентября по декабрь 2016 г. Мазки собирали в первые сутки госпитализации и не позднее 6 суток от начала заболевания, подвергали замораживанию и хранили при температуре -70°C до проведения исследований, но не более 2 месяцев. Для выявления нуклеиновых кислот возбудителей ОРВИ методом ПЦР с детекцией в реальном времени использована тест-система «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL».

МИФА проводили в 96-луночной планшете Nunc. Для этого в монослойную культуру клеток A-549 вносили клинические материалы по 10 мкл для первого пассажа. Для последующих пассажей использовали культуральную жидкость (КЖ) предыдущего пассажа в разведении 1:2. Всего было проведено 5 последовательных пассажей. Контроль клеточного монослоя на наличие ЦПД проводили ежедневно в течение 3 суток под световым микроскопом. Через 72 ч клеточную культуру фиксировали 80 % ацетоном. Наличие АВ антигенов определяли в реакции с пероксидазным конъюгатом моноклональных антител к гексону АВ (получен в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, г. Санкт-Петербург). Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси. После остановки реакции с помощью 2н H_2SO_4 измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (ОП450). Отрицательным контролем служили не зараженная клеточная культура и культура, в которую были внесены клинические материалы, отрицательные на наличие АВ методом ПЦР. Положительными по содержанию АВ антигена были признаны пробы, ОП450 которых превышали в 2 и более раза ОП450 отрицательного контроля. КЖ материалов, признанных положительными на наличие АВ по данным МИФА, титровали в культуре клеток A-549 с целью определения их инфекционной активности.

Результаты. 68 клинических образцов исследовали методом ПЦР на наличие возбудителей ОРВИ. По данным ПЦР АВ обнаружили в 27 образцах, при этом в 2 случаях АВ обнаруживались в сочетании с респираторно-синтициальным вирусом (РС) и риновирусом. В 10 материалах было обнаружены возбудители других ОРВИ, а именно: в 9 — риновирус, в 1 — РС вирус, 31 материал был отрицательным по результатам ПЦР. Циклы выделения в ПЦР АВ варьировали от 4 до 30. По результатам МИФА на первом-втором пассаже АВ были выделены из 10 клинических материалов, у которых циклы выделения АВ в ПЦР не превышали 13. Инфекционная активность АВ в этих материалах достигала $6 \lg \text{ТИД}_{50}/\text{мл}$. При дальнейшем пассировании положительными на наличие АВ были признаны еще 4 материала с циклами выделения в ПЦР с 12 по 14. Инфекционная активность АВ в них была значительно ниже и не превышала $2 \lg \text{ТИД}_{50}/\text{мл}$. Таким образом, из 27 образцов, положительных на наличие АВ по данным ПЦР, удалось выделить из 14.

Выводы. Выделение вируса в клеточной культуре до сих пор остается «золотым стандартом» в вирусологической практике. Однако этот метод имеет ряд недостатков: длительность проведения, высокая стоимость, требования к квалификации проводящего анализ персонала, субъективность визуальной оценки цитопатических изменений клеточной культуры. Использование метода МИФА позволяет сократить время проведения анализа, исследовать микроколичества исходного материала, проводить учет результатов полуколичественным ИФА. К другим преимуществам МИФА можно отнести простоту его проведения, экономичность, возможность исследования большого количества материалов одновременно.

Чувствительность и специфичность МИФА составили 51,9 % и 100 %, соответственно, что сопоставимо с показателями для выделения вируса в культуре клеток. В материалах с циклами выделения в ПЦР больше 14 выделить АВ не удалось.

Возможно, это связано с низким содержанием АВ в исходном материале и необходимо использовать большие количества для заражения культуры клеток. Другой причиной может быть наличие в исходном материале персистирующих АВ, репликация которых в клетках низка.

Положительные в МИФА образцы будут использованы для создания банка циркулирующих в популяции АВ, определения их серотипа и генотипирования. Полученные данные демонстрируют перспективность использования МИФА в качестве альтернативы классическому выделению вируса в культуре клеток.

Литература

1. Маркова, Т. П. Острые респираторные инфекции. Профилактика и лечение / Т. П. Маркова, Л. Г. Ярилина // Рус. мед. журн. — 2012. — № 12. — С. 628–631.
2. Viral etiology of community-acquired pneumonia among adolescents and adults with mild or moderate severity and its relation to age and severity / J. X. Qu [et al.] // BMC Infect. Dis. — 2015. — Vol. 15. — P. 89–97.
3. Львов, Н. И. Аденовирусная инфекция у военнослужащих: клиника, диагностика и лечение: автореф. дис. ...д-ра мед. наук: 14.01.09 / Н. И. Львов; Воен.-мед. акад. им. С.М. Кирова. — СПб, 2016. — 33 с.
4. Амосова, И. В. Разработка и усовершенствование средств и методов иммунодиагностики аденовирусной инфекции: автореф. дис. ...канд. биол. наук. 03.00.06 / И. В. Амосова; Науч.-исслед. ин-т гриппа. — СПб, 2009. — 25 с.

APPLICATION OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR IDENTIFICATION OF ADENOVIRUSES IN CELL CULTURE

T.A. Timoshicheva¹, I.V. Amosova¹, Buzitskaya Zh.V.¹, Lvov N.I.²

¹Research Institute of Influenza of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia;

²S.M. Kirov Military Medical Academy of Ministry of Defence of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

The aim of the work was to study the possibilities of using cell culture enzyme linked immunosorbent assay (cell ELISA) to isolate adenoviruses from humans. The use of cell ELISA allows to short the analysis time, to study the micro-quantities of the initial material, and to record the results with semi quantitative ELISA. Other advantages of cell ELISA include simplicity of its implementation, economy, and the possibility to investigate a large number of materials simultaneously.

Keywords: cell ELISA, adenovirus, human, virus isolation, cell culture.

Поступили 28.08.2017

НАДЗОР ЗА ОСТРЫМИ ВЯЛЫМИ ПАРАЛИЧАМИ У ДЕТЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НОВОГО АЛГОРИТМА ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В БЕЛАРУСИ В 2016 г.

И.Ф. Ухова, Е.О. Самойлович, М.А. Ермолович, Е.Ю. Свирчевская
ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Беларусь

Резюме. В 2016 г. в Беларуси в рамках надзора за полиомиелитом был зарегистрирован и обследован 71 случай острого вялого паралича (ОВП). От двух (2,8 %) детей были изолированы аденовирусы, от одного (1,4 %) — Coxsackievirus B2 и от одного (1,4 %) — ПВ3. Штамм ПВ3 являлся вакцинным штаммом с гомотипичной организацией генома. Случай с выделением ПВ был классифицирован как ОВП неполиомиелитной этиологии.

Ключевые слова: полиовирус, неполиомиелитный вирус, острый вялый паралич.

Введение. Усилия ВОЗ и стран по искоренению полиомиелита привели к провозглашению эрадикации дикого полиовируса (ПВ) типа 2, объявленном Глобальной комиссией по сертификации искоренения полиомиелита в 2015 г. [1].

Вакцино-родственные ПВ (ВРПВ) способны дивергировать от вакцинных штаммов Себина в сторону повышения нейровирулентности и служить потенциальным источником вспышек паралитического полиомиелита при попадании в организм неиммунных лиц при низком уровне охвата вакцинацией или иммунодефицитных лиц. Поскольку наибольшее количество вспышек было связано с ВРПВ типа 2, в апреле 2016 г. одновременно по всему миру была прекращено использование вакцинного штамма Себина типа 2 для иммунизации населения [1].

В сложившихся условиях всем странам рекомендовано максимально усилить мероприятия по надзору за полиомиелитом с целью получения убедительных доказательств приостановления распространения вакцинного штамма Себина серотипа 2 из образцов стула людей и из других источников окружающей среды [1].

В Республике Беларусь случай выявления ВРПВ серотипа 2 был зарегистрирован в 2007 г., когда от ребенка с иммунодефицитом был изолирован вирус с уровнем дивергенции от оригинального вакцинного вируса 1,88 % [2].

Основопологающим в надзоре за полиомиелитной инфекцией по-прежнему остается мониторинг заболеваемости острым вялым параличом (ОВП) среди детей до 15 лет. В Беларуси все мероприятия по выявлению и регистрации случаев проводятся в соответствии с критериями ВОЗ. Все исследования по выделению, идентификации и молекулярно-генетическому изучению вирусов, выявленных в стране от детей с ОВП, осуществляются в аккредитованном ВОЗ Национальном референс-центре по полиомиелиту (НРЦП), функционирующем при РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

В данном исследовании представлены результаты клинико-эпидемиологического и вирусологического обследования случаев ОВП, зарегистрированных в Беларуси в 2016 г.

Материалы и методы. В январе 2016 г. в работу НРЦП был введен новый рекомендованный ВОЗ алгоритм по вирусологическому исследованию образцов стула детей с ОВП. Алгоритма направлен на ускоренную идентификацию ПВ уже на стадии исследования образцов стула с помощью перевиваемых культур клеток — L20В (генетически модифицированная линия мышечных клеток, содержащая рецепторы к ПВ) и RD (клетки рабдомиосаркомы человека). Суточный монослой культур клеток одновременно заражали 10 % фекальными суспензиями. В течение 5–7 дней проводили

ежедневное микроскопирование клеток. Если при заражении культуры клеток не визуализировалось наличие цитопатогенного агента (ЦПА), то проводили последующее пассирование в той же культуре клеток. Если при заражении обнаруживался ЦПА, то проводили перекрестный пассаж в культуре клеток другого вида (т.е. с L20B на RD и с RD на L20B). Данный алгоритм пассирования позволял дифференцировать образцы стула как: L+R+ (положительный с подозрением на наличие ПВ), L-R+ (положительный в отношении неполиомиелитных вирусов), L-R- (отрицательный).

Дальнейшую идентификацию ЦПА с подозрением на наличие ПВ осуществляли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к трем серотипам ПВ, с подозрением на наличие неполиомиелитных вирусов — в реакции нейтрализации с использованием типоспецифических сывороток к энтеровирусам (Институт общественного здравоохранения, Билтховен, Нидерланды) [3]. Идентификацию ЦПА с круглоклеточной дегенерацией осуществляли в ПЦР с использованием диагностической тест-системы «Adenovirus-EPh» («АмплиСенс», Россия).

Для выявленных ПВ был выполнен анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) двух значимых областей генома вируса — кодирующей N-концевую часть структурного белка VP1 (ПДРФ-1) и кодирующей фрагмент неструктурного белка вирусной 3D-полимеразы (ПДРФ-3D1).

Для «нетипируемых» в реакции нейтрализации неполиомиелитных вирусов была выполнена ОТ-ПЦР с парой праймеров 292/222 к VP1 области генома энтеровирусов с использованием коммерческого набора для одностадийной ОТ-ПЦР «QIAGEN OneStep RT-PCR Kit» (QIAGEN, Германия).

Выявленный энтеровирус был секвенирован в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе (Model 3100 Avant, Applied Biosystems, США). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0.

Результаты и обсуждение. Согласно данным официальной регистрации ОВП, количество выявленных случаев заболевания у детей до 15 лет в стране возросло с 61 случая, зарегистрированного в 2015 г. [4], до 71 случая в 2016 г. Показатель регистрации ОВП на национальном уровне в 2016 г. составил 4,7 на 100 000 детей и колебался в регионах от 1,2 (Гродненская область) до 7,3 (г. Минск). В основном случаи заболевания были выявлены у детей в возрасте 6–15 лет (48 из 71, 67,6 %). Подавляющее большинство (68 из 71; 95,8 %) детей были привиты не менее чем тремя дозами полиомиелитной вакцины. Один ребенок был привит двумя дозами. Еще двое детей оставались непривитыми (ребенок в возрасте 2 месяцев не достиг возраста вакцинации, родители другого двухлетнего ребенка отказались от проведения вакцинации). Эти три случая были отнесены к категории «горячих».

От всех детей были собраны по два образца стула. Сбор образцов был осуществлен в первые 14 дней от начала развития заболевания у 66 (93,0 %) детей, а от пяти (7,0 %) детей из Брестской (2), Гомельской (1), Минской (1) областей — в более поздние сроки. Все 142 образца стула были доставлены в трехдневный срок в НРЦП в соответствии с режимом доставки инфекционного материала.

Все образцы стула были вирусологически исследованы на перевиваемых культурах клеток L20B и RD с помощью ускоренного алгоритма, разработанного ВОЗ. Использование перекрестного пассирования на двух культурах позволило выявить ЦПА в образцах стула трех детей. У всех детей вирусы выявлялись как в первом, так и во втором образцах стула. Два вируса из шести были отнесены к категории с клеточной дегенерацией L-RD+, что свидетельствовало о содержании неполиомиелитного вируса,

и четыре — к категории L+RD+, подозрительной на наличие ПВ. Однако, у двух из четырех вирусов категории L+RD+ визуализировалась круглоклеточная дегенерация обеих линий, что является характерным для аденовирусов. Все ЦПА категории L+RD+ согласно рекомендации ВОЗ были доставлены в трехдневный срок в Региональный референс-центр по полиомиелиту (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, г. Москва) для проведения внутритиповой дифференциации.

В НРЦП также было проведено дополнительное вирусологическое исследование образцов стула на культуре клеток HEp2C, что позволило выявить ЦПА с характерной для аденовирусов круглоклеточной дегенерацией клеток еще у одного ребенка, но только во втором образце стула.

Присутствие аденовируса в трех образцах с выявленной круглоклеточной дегенерацией клеток было подтверждено в ПЦР с праймерами к аденовирусам.

Серотипирование двух ЦПА категории L+RD+ с подозрением на наличие ПВ в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ трех серотипов показало, что ПВ присутствует в обоих образцах стула в виде монотипа, относящегося к серотипу 3. Молекулярно-генетическое исследование этого ПВ с помощью ПДРФ анализа двух дистальных областей генома, кодирующих основной структурный белок VP1 и белок вирусной 3D-полимеразы, представило убедительные данные о принадлежности выявленного вируса к вакцинному ПВ3 с гомотипичной организацией генома.

Серотипирование ЦПА категории L-RD+, выявленных в обеих пробах одного из детей, в реакции нейтрализации с использованием типоспецифических сывороток к энтеровирусам не позволило определить серотип вируса, так как данный вирус не нейтрализовался ни одним пулом сывороток данного набора. Выполнение ОТ-ПЦР с праймерами 292/222 к VP1 области генома вирусов показало наличие специфического амплификационного профиля длиной в 338 п.о., что свидетельствовало о принадлежности данных вирусов к энтеровирусам. Для подтверждения специфичности амплификации было проведено секвенирование амплифицированного фрагмента кДНК одного из двух вирусов. Для вируса была установлена его принадлежность к Coxsackievirus B типа 2.

Всего вирусы были обнаружены в семи образцах стула от четырех (5,6 %) из 71 детей: от одного (1,4 %) ребенка был изолирован ПВ3, от одного (1,4 %) — Coxsackievirus B2 и от двух (2,8 %) — аденовирусы. В «горячих» случаях вирусы выявлены не были.

Закономерной тенденцией последних лет является значительное снижение циркуляции ПВ в стране [4]. Два ПВ3 2016 г. были изолированы от ребенка в возрасте 5 лет, постоянно проживающего в России и прибывшего в Беларусь за 2 недели до начала развития заболевания. Ребенок был привит бивалентной ОПВ за 56 дней до начала заболевания. На основании клинических данных, данных иммунологического обследования и результатов молекулярно-генетического изучения выделенного ПВ3, диагноз вакцино-ассоциированного паралитического полиомиелита был исключен и выставлен диагноз острая менингоэнцефаломиелополинейропатия.

Coxsackievirus B2 был изолирован от ребенка в возрасте 4 лет с поражением плечевого сплетения из Могилевской области. Аденовирусы были обнаружены у двух детей в возрасте одного года и пяти лет из Гомельской и Могилевской областей. В обоих случаях вялый парез развился на фоне ОРИ, фебрильной лихорадки.

На основании полученных данных все случаи ОВП 2016 г. были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной этиологии.

Заключение. Таким образом, в Республике Беларусь в 2016 г. выявление и обследование заболеваний с синдромом ОВП проводилось своевременно

и в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Вся информация по результатам вирусологических исследований случаев ОВП еженедельно представлялась в Европейское региональное бюро ВОЗ в формате базы данных Laboratory Data Management System. Молекулярно-генетическое исследование изолированного ПВ3 показало, что вирус является вакцинным штаммом и не является ВРПВ.

Литература

1. ВОЗ. Полиомиелит: информ. бюлл. [Электронный ресурс]. — 2016. — № 114. — Режим доступа : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/ru/>. — Дата доступа : 27.09.2017.
2. Изоляция полио- и непوليوмиелитных вирусов от детей с синдромом острого вялого паралича при различных схемах иммунизации против полиомиелита / И. Ф. Ухова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2008. — Вып. 1. — С. 319–322.
3. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. – Женева: ВОЗ, 2005. — 112 с.
4. Молекулярно-генетическая характеристика вирусов, изолированных от детей с синдромом острого вялого паралича в Беларуси в 2012–2015 гг. / И. Ф. Ухова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2015. — Вып. 8. — С. 25–30.

ACUTE FLACCID PARALYSIS SURVEILLANCE ACCORDING TO NEW ALGORITHM OF VIROLOGICAL INVESTIGATION IN BELARUS, 2016

I.F. Uhava, E.O. Samoilovich, M.A. Yermalovich, E.Yu. Svirchevskaya
Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

In 2016, 71 acute flaccid paralysis (AFP) cases were recorded and examined in Belarus. Adenoviruses were isolated from two (2.8 %) children, from one (1.4 %) Coxsackievirus B2, and from one (1.4 %) — PV3. The strain PV3 was a vaccine with homotypic genome organization. The case with PV isolation was classified as AFP of non-polio etiology.

Keywords: poliovirus, non-poliomyelitis virus, acute flaccid paralysis syndrome.

Поступили 29.09.2017

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВРЕМЕННОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ

Г.Н. Чистенко

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Ключевые слова: эпидемиологический метод, эпидемиология неинфекционных болезней, заболеваемость.

XX век в борьбе с инфекционными заболеваниями оказался неоднозначным. С одной стороны, существенно снижены показатели заболеваемости и смертности от многих инфекционных болезней (корь, дифтерия, скарлатина, брюшной тиф, дизентерия, вирусный гепатит А и др.). На глобальном уровне ликвидирована натуральная оспа, на заключительный этап вышла работа по глобальной ликвидации полиомиелита. Предпринимаются значительные усилия по региональной ликвидации

(элиминации) кори и краснухи в странах Европейского региона. По оценкам экспертов увеличение средней продолжительности жизни в экономически развитых странах во многом обусловлено успехами в снижении заболеваемости инфекционными болезнями.

Несмотря на снижение заболеваемости инфекционными болезнями, а также на то, что усилия по профилактике этой группы заболеваний не снижались, в последней четверти XX века в области инфекционной патологии произошли два события: 1) появились новые инфекционные заболевания (СПИД, легионеллез, болезнь Лайма, геморрагические лихорадки, ТОРС, всего около 30 заболеваний); 2) возвратились, казалось бы, ликвидированные инфекции (малярия, дифтерия, туберкулез и др.). Характерными признаками нынешней глобальной эпидемической ситуации в мире являются: необычная персистентная форма пандемии холеры; пандемия ВИЧ/СПИДа; широкое распространение туберкулеза, вызванного лекарственно устойчивыми микобактериями; распространение малярии и лихорадки денге в тропических и субтропических регионах [1].

На фоне снижения заболеваемости инфекционными болезнями в XX веке в экономически развитых странах отмечен повсеместный рост заболеваемости хроническими неинфекционными болезнями. Неинфекционные заболевания, как правило, имеют продолжительное течение и являются результатом воздействия комбинации генетических, физиологических, экологических и поведенческих факторов. К основным типам неинфекционных заболеваний относятся сердечно-сосудистые заболевания (такие, как инфаркт и инсульт), онкологические заболевания, хронические респираторные заболевания (такие, как хроническая обструктивная болезнь легких и астма) и диабет. Каждый год от неинфекционных заболеваний умирает 40 миллионов человек, что составляет 70 % всех случаев смерти в мире. При этом 17 миллионов человек умирают в возрасте до 70 лет [2].

В условиях меняющейся эпидемической ситуации эпидемиология, как диагностическая дисциплина профилактической медицины, продолжает совершенствовать методы изучения эпидемического процесса, эпидемиологического надзора и профилактики инфекционных болезней. Наряду с этим, сферой интересов эпидемиологии, как общемедицинской дисциплины, все больше и больше становятся хронические неинфекционные заболевания, а в медицинской науке и практике все чаще фигурирует термин «эпидемиология неинфекционных болезней».

Эпидемиологический метод, сформировавшийся в недрах эпидемиологии инфекционных болезней, оказался очень эффективным при изучении закономерностей распространения среди населения болезней неинфекционной природы. Эпидемиологические исследования помогли: установить роль курения в развитии рака легкого; расшифровать ряд распространенных генетических заболеваний крови; изучить распространенность сердечно-сосудистых и профессиональных заболеваний; разработать программы по профилактике неинфекционных болезней [3].

Основной постулат теоретической концепции эпидемиологии неинфекционных болезней сформулирован академиком В.Д.Беляковым и звучит как: «Распределение заболеваемости неинфекционными болезнями среди различных групп населения, во времени и по территории является обобщенным результатом взаимодействия специфических средовых патогенных факторов и структуры населения, неоднородного по признаку восприимчивости к болезням с учетом латентного периода их развития» [4].

Данное определение имеет фундаментальный характер, так как указывает на принципиальные пути формирования заболеваемости населения неинфекционными болезнями. Практическая значимость этого определения состоит в том, что если заболеваемость неинфекционными болезнями формируется в результате

взаимодействия популяции людей с патогенными средовыми факторами, то рациональная профилактика заболеваемости состоит в исключении из взаимодействия или в ослаблении действия патогенных средовых факторов.

Целью эпидемиологии неинфекционных болезней является установление количественных закономерностей формирования заболеваемости населения хроническими неинфекционными болезнями и разработка путей ее контроля.

К основным задачам эпидемиологии неинфекционных болезней относятся:

- количественная оценка распространения болезни и предболезни в популяции;
- формирование и проверка гипотез этиологии и патогенеза болезни;
- проведение популяционных (эпидемиологических) исследований;
- разработка программ профилактических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости;
- оценка эффективности программ профилактических мероприятий.

В настоящее время накоплены многочисленные фактические данные по эпидемиологическим проявлениям различных хронических неинфекционных болезней. Глубокий анализ этой информации необходим для дальнейшего развития теоретических обобщений по закономерностям и особенностям процесса формирования и распространения хронических неинфекционных болезней. Такие обобщения являются необычайно важными, так как эпидемиология неинфекционных болезней характеризуется целым рядом особенностей, отличающихся от традиционных положений классической эпидемиологии инфекционных болезней (таблица)

Таблица — Особенности эпидемиологии неинфекционных болезней

№ п/п	Содержание признаков, характерных для эпидемиологии неинфекционных болезней
1.	Продолжительный латентный период неинфекционных заболеваний (конкретный срок его непредсказуем).
2.	Постепенное развитие хронических неинфекционных заболеваний.
3.	Многофакторная природа этиологии и патогенеза неинфекционных заболеваний (явно доминирующий фактор часто отсутствует).
4.	Невозможность выделения невосприимчивой части популяции и установления индивидуальной устойчивости к определенному неинфекционному заболеванию.
5.	Прогнозы заболеваемости и эффективности профилактических мероприятий носят вероятностный характер и оправдываются в отношении популяции в целом.

В стратегическом плане для реализации концепции эпидемиологии неинфекционных болезней необходимо разработать и создать информационно-аналитические системы и системы управления. Назрела необходимость перехода от медицинской статистики к системам типа эпидемиологического надзора (клинико-эпидемиологического мониторинга) за отдельными неинфекционными заболеваниями, и всей соматической патологией. Необходимо поступательное движение от отдельных профилактических мероприятий и программ — к системе управления заболеваемостью населения [3, 5].

Первыми практическими шагами по организации научно обоснованных исследований в области эпидемиологии неинфекционных болезней в нашей стране должны стать мероприятия по созданию рабочей инициативной группы из заинтересованных специалистов, научных и практических учреждений здравоохранения. Затем необходимо определить в каждой области по одному экспериментальному административному району для проведения эпидемиологических исследований. Следует сформировать четкий перечень нозологических форм хронических неинфекционных заболеваний (целевые болезни эпидемиологии

неинфекционных болезней). Важными шагами должны явиться разработка электронной карточки для сбора информации о целевых болезнях и определение порядка сбора и передачи информации, а также разработка методических рекомендаций для анализа информации о целевых болезнях.

Реализация перечисленных выше мероприятий позволит проводить серьезные эпидемиологические исследования в области эпидемиологии неинфекционных болезней. Результаты этих исследований являются жизненно важными для рациональной профилактики заболеваемости населения хроническими неинфекционными болезнями.

Литература

1. Шагинян, И. А. Тенденции развития эпидемиологии в XXI веке [Электронный ресурс]. — 2017. — Режим доступа : <https://www.google.by/search?q>. — Дата доступа : 15.09.2017.
2. Неинфекционные заболевания Информационный бюллетень Апрель 2017 г. [Электронный ресурс]. — 2017. — Режим доступа : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/ru/>. — Дата доступа : 15.09.2017.
3. Брико, Н. И. Актовая речь «Парадигма современной эпидемиологии» / Н. И. Брико. — М. : Изд-во Первого Московского гос. мед. ун-та им. И. М. Сеченова, 2013. — 74 с.
4. Белов, А. Б. Академик В. Д. Беляков — основоположник отечественной теории эпидемиологической науки XXI века / А. Б. Белов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2016. — Т. 15, № 6. — С. 9–15.
5. Шкарин, В. В. О концепции развития отечественной эпидемиологии: 5 лет спустя / В. В. Шкарин, О. В. Ковалишена // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2013. — № 1. — С. 9–14.

ACTUAL ISSUES OF MODERN EPIDEMIOLOGY

G.N. Chistenko

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The concept of the epidemiology of noncommunicable diseases was justified. One of the ways to implement it is the need to create a working initiative group of interested specialists in the organization of scientifically based research in the epidemiology of noncommunicable diseases in our country.

Keywords: epidemiological method, epidemiology of noncommunicable diseases, morbidity.

Поступили 28.09.2017

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

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) *фамилии и инициалы авторов — указываются ниже строчными буквами курсивом нежирным 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 реферат. Текст реферата 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 реферата 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 единиц 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 (подрисовочный 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: rrcem@belriem.by или belriem@gmail.com
<http://www.belriem.by>

СОДЕРЖАНИЕ

НАУЧНО-ИННОВАЦИОННАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СЛЕЖЕНИЯ ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Горбунов В.А., Дронина А.М., Носова Е.С., Петкевич А.С., Карабан И.А., Федоров Ю.Е., Филонюк В.А., Жукова Н.П.</i>	3
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ	10
ЭНТЕРОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Амеросьева Т.В., Богуш З.Ф., И.Н. Глинская, Бискина Н.М., Поклонская Н.В., Лозюк С.К.</i>	10
СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РАССЛЕДОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КИШЕЧНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ <i>Амеросьева Т.В., Богуш З.Ф., Казинец О.Н., Поклонская Н.В., Шилова Ю.А., Лозюк С.К., Аринович А.С.</i>	17
МЕНИНГОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ И РЕГИОНАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Бандацкая М.И., Горбачева Е.В., Дронина А.М., Чистенко Г.Н.</i>	24
ПОСЛЕДСТВИЯ ГЛОБАЛЬНОГО ПОТЕПЛЕНИЯ КЛИМАТА — ИЗМЕНЕНИЕ АРЕАЛОВ КРОВОСОСУЩИХ ЭКТОПАРАЗИТОВ И ПЕРЕНОСИМЫХ ИМИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ <i>Бычкова Е.И., Дубинина Е.В., Якович М.М.</i>	29
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ ПРОТИВ ГРИППА <i>Высоцкая В.С., Глинская И.Н., Карабан И.А., Пашкович В.В., Гринь В.В., Шмелева Н.П., Грибкова Н.В.</i>	39
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ДИРОФИЛЯРИОЗУ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Корзан А.И., Ярец Л.Н., Чирцова С.В., Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В., Подушкина Е.В., Карташев В.В., Carreton E., Simon F.</i>	47
ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДОНОРОВ С ВЫЯВЛЕННЫМИ HBsAg и aHCV <i>Красавцев Е.Л., Поварова Д. В.</i>	52
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА <i>Лапо Т.П., Сивец Н.В., Шмелёва Н.П., Грибкова Н.В.</i>	56

ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ <i>Мамчиц Л.П., Чайковская М.А.</i>	64
ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Русанович А.В., Сергеенко С.В., Карабан И.А., Глинская И.Н.</i>	70
ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У ПАЦИЕНТОВ С СЕЗОННЫМИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ ЛИХОРАДКАМИ <i>Самойлова Т.И., Колтунова Ю.Б., Дракина С.А., Рустамова Л.М., Яшкова С.Е., Соловьева Е.В., Цвирко Л.С., Горбунов В.А.</i>	74
ИЗУЧЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ ЗА 2014–2016 гг. <i>Самойлова Т.И., Красько А.Г., Залевская О.С., Яшкова С.Е., Косолапова В.Н., Колтунова Ю.Б., Соловьева Е.В., Цвирко Л.С., Сеньковец Т.А.</i>	77
ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ И МОШЕК В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ БЕЛАРУСИ <i>Самойлова Т.И., Красько А.Г., Залевская О.С., Яшкова С.Е., Косолапова В.Н., Рустамова Л.М., Цвирко Л.С., Соловьева Е.В., Петкевич А.С.</i>	81
БОКАВИРУС В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Сивец Н.В., Шмелёва Н.П., Грибкова Н.В., Лапо Т.П.</i>	85
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ СОДЕРЖАЩИХ ВОДУ ТЕХНОГЕННЫХ ОБЪЕКТОВ КАК ОСНОВА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СЛЕЖЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА <i>Тонко О.В., Коломиец Н.Д., Ханенко О.Н., Красько А.Г., Федорович Е.В., Фидаров Ф.М., Бусел С.А.</i>	93
БЕШЕНСТВО В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ. ФАКТОРЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ <i>Ханенко О.Н., Коломиец Н.Д., Тонко О.В.</i>	100
ВОЗБУДИТЕЛИ ТЯЖЕЛЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В СЕЗОН 2016–17 гг. <i>Шмелёва Н.П., Сивец Н.В., Лапо Т.П., Грибкова Н.В.</i>	107
МИКРОБИОЛОГИЯ	114
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ САМОСБОРКИ АМИЛОИДОВ A β 40, A β 42, ПРИОННОГО PrP ₂₇₋₃₀ БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛИЦ С ДИСТРОФИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ <i>Асташонок А.Н., Полещук Н.Н., Докукина Т.В., Рубаник Л.В.</i>	114

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ДРУГИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ <i>Асташонок А.Н., Докукина Т.В., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н.</i>	122
АНАЛИЗ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРОВИ И ЦСЖ ПАЦИЕНТОВ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ В УЗ ГКИБ В 2012–2016 гг. <i>Зайцева В.Н., Т.А. Рогачева, Л.И. Белановская, Л.А. Анисько, Н.В. Соловей</i>	127
СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ ЛЯРВАЛЬНЫХ ГЕЛЬМИНТОЗОВ ЧЕЛОВЕКА (ЭХИНОКОККОЗ И АЛЬВЕОКОККОЗ) <i>Иванова М.А.</i>	133
ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Касницкая Т.Н., Счеслёнок Е.П., Семижон П.А., Дубков Н.А., Бусел С.А., Федорович Е.В., Владыко А.С.</i>	138
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Коломиец Н.Д., Тонко О.В., Левшина Н.Н., Филипенок С.С., Федорович Е.В., Дудчик Н.В., Войтик С.Б., Красько А.Е., Гулин В.В., Глинская И.Н., Наройчик Л.К.</i> ...	147
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МАТРИКСА МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ К ФЕРМЕНТАМ И АНТИСЕПТИКАМ <i>Колчанова Н.Э., Феришиши Б.Б.Н., Окулич В.К., Сенькович С.А., Алексейкова В.В.</i>	156
ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИМ ПЕРИОДОНТИТЕ <i>Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е.</i>	160
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИДОВОГО СОСТАВА КИШЕЧНОЙ БИФИДОФЛОРЫ В ПАРАХ МАТЬ-РЕБЕНОК <i>Костюк С.А., Нагибович С.Ю., Григоренко Ю.А., Полуян О.С., Руденкова Т.В., Глинкина Т.В.</i>	168
ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ <i>LACTOBACILLUS</i> SPECIES ПРИ НОРМОЦИНОЗЕ, МЕЗОЦИНОЗЕ И ДИСБИОЗЕ ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН <i>Костюк С.А., Полуян О.С., Руденкова Т.В., Шиманская И.Г.</i>	173
РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО УЧЕТА ТЕСТ-СИСТЕМ С ЦЕЛЬЮ ИДЕНТИФИКАЦИИ СТРЕПТОКОККОВ <i>Окулич В.К., Плотников Ф.В., Кабанова А.А., Шилин В.Е., Бабака Н.К.</i>	178
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИОННЫХ ИММУНОМАГНИТНЫХ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ CdSe/ZnS НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> ПРИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ <i>Рубаник Л.В., Асташонок А.Н., Жавнерко Г.К., Полещук Н.Н.</i>	183

ТУБЕРКУЛЕЗНОЕ ПОРАЖЕНИЕ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ <i>Тищенко Г.В.</i>	188
РАСПРОСТРАНЕНИЕ НЕКРОБАКТЕРИОЗА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Финогенов А.Ю., Финогенова Е.Г.</i>	190
РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОТИПОВ ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ <i>сag PAIH. PYLORI</i> У ПАЦИЕНТОВ С ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗОМ <i>Янович О.О., Дорошко М.В.</i>	196
ВИРУСОЛОГИЯ	201
ВИРУСНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ: МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ, ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ <i>Амеросьева Т.В., Казинец О.Н., Поклонская Н.В., Шилова Ю.А., Лозюк С.К., Богущ З.Ф.</i>	201
МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИНДИКАЦИИ ВИРУСОВ-КОНТАМИНАНТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА <i>Амеросьева Т.В., Поклонская Н.В., Казинец О.Н., Лозюк С.К., Шилова Ю.А., Богущ З.Ф., Аринович А.С.</i>	206
ВКV И JCV ИНФЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ <i>Амеросьева Т.В., Богущ З.Ф., Кишкурно Е.П., Поклонская Н.В., Аринович А.С., Байко С.В.</i>	211
СЕКОТРИТЕРПЕНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНГИБИТОРЫ ВИРУСА ГЕРПЕСА <i>Бореко Е.И., Савинова О.В.</i>	215
СКРИНИНГ-ТЕСТ: БЛЯЩЕЧНЫЕ МУТАНТЫ ВИРУСОВ В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ <i>Бореко Е.И., Павлова Н.И., Владыко Г.В.</i>	222
О СЛУЧАЯХ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В., Глебка Л.В., Рудая Л.Н.</i>	228
ГЕРПЕСВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ <i>Кравис Э., Дракина С.А., Пинчук А.С., Шамрук И.В., Докукина Т.В.</i>	236
ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ БЕССИМПТОМНОЙ ФОРМЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА <i>Кузьяев Р.З.</i>	239

СМЕШАННАЯ КРИОГЛОБУЛИНЕМИЯ, СВЯЗАННАЯ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С: ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ, КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И ВЗАИМОСВЯЗИ <i>Лукашик С.П., Карпов И.А., Мартусевич Н.А., Анисько Л.А., Еремин В.Ф.</i>	242
ПОЯВЛЕНИЕ РОТАВИРУСА ГЕНОТИПА G12P[8] В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Полякова Н.В., Самойлович Е.О., Семейко Г.В.</i>	246
ВЫЯВЛЕНИЕ БЕТА-ГЕРПЕСВИРУСОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ ФОРМОЙ ШИЗОФРЕНИИ <i>Штыров А.А., Орлова С.В., Докукина Т.В., Мохров М.В.</i>	251
ОПЫТ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С HCV-ИНФЕКЦИЕЙ ПОСЛЕ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ <i>Яговдик-Тележная Е.Н.</i>	255
PERSISTENT HHV-6, HHV-7 AND PARVOVIRUS B19 INFECTION AS TRIGGER FACTOR OF RHEUMATOID ARTHRITIS AND OSTEOARTHRITIS DEVELOPMENT <i>M. Murovska, A. Kadisa, Z. Nora-Krukla, S. Skuja, V. Groma, A. Lejnieks</i>	261
ПЕРСИСТИРУЮЩАЯ ИНФЕКЦИЯ ГЕРПЕСВИРУСА ЧЕЛОВЕКА 6, 7 И ПАРВОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА B19 КАК ПУСКОВОЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА И ОСТЕОАРТРИТА <i>М. Муровска, А. Кадыша, З. Нора-Крукле, С. Скуя, В. Грома, А. Лейниекс</i>	265
PRESENCE OF PARVOVIRUS B19 GENOMIC SEQUENCES AND EXPRESSION OF B19 ANTIGENS IN TISSUE FROM POST-MORTEM INDIVIDUALS WITH UNSPECIFIED ENCEPHALOPATHY <i>A. Vilmane, S. Skuja, S. Roga, S. Rasa, Z. Nora-Krukla, M. Murovska</i>	266
НАЛИЧИЕ ГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ ПАРВОВИРУСА B19 В ПОСТМОРТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ ЛИЦ С ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ НЕЯСНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ <i>А. Вилмане, С. Скуя, С. Роба, С. Раса, З. Нора-Крукле, М. Муровска</i>	269
ИММУНОЛОГИЯ	270
ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА НА ИММУНОФЕНОТИП В-КЛЕТОК <i>Антоневич Н.Г., Гончаров А.Е., Буццик О.В., Романова И.В.</i>	270
СУБПОПУЛЯЦИИ ЭФФЕКТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОАРТРИТОМ КОЛЕННЫХ СУСТАВОВ <i>Гончаров А.Е., Дуж Е.В., Романова И.В., Дегтерева О.В.</i>	276

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ И ПОВТОРЯЕМОСТЬ ПРИ ГЕЙТИРОВАНИИ БАЗОФИЛОВ РАЗНЫМИ СПОСОБАМИ <i>Гончаров А.Е., Романова И.В.</i>	283
ВЫБОР ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ <i>Романова И.В., Гончаров А.Е.</i>	287
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 2–3 ноября 2017 г.	292
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ <i>CANDIDA ALBICANS</i> НА СРЕДЕ САБУРО С 2,3,5–ТРИФЕНИЛТЕТРАЗОЛИЯ ХЛОРИСТЫМ <i>Буткевич В.В., Циркунова Ж.Ф., Слабко И.Н., Бердник Н.Н.</i>	292
ДИНАМИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА СКАРЛАТИНЫ В ЗАВОДСКОМ РАЙОНЕ Г. МИНСКА <i>Дронина А.М., Бандацкая М.И., Ланкевич Т.С., Лойко В.С.</i>	294
ЛАБОРАТОРНО ПОДТВЕРЖДЕННЫЕ СЛУЧАИ КОКЛЮША: ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ, СЕЗОННОСТЬ, ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРА <i>Колодкина В.Л., Мартынов В.С.</i>	298
ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА С ЛЕЙКОЦИТАМИ ОПУХОЛИ МЕТОДОМ ИНТРАВИТАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ <i>Науменко В., Махони Д., Дженни К.</i>	301
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ СРЕДСТВАМ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ <i>P. AERUGINOSA</i> НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК <i>Пугач В.В., Аноп А.А., Шишпорёнок Ю.А., Горбунов В.А., Титов Л.П.</i>	303
УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ <i>S. MARCESCENS</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Пугач В.В., Аноп А.А., Шишпорёнок Ю.А., Горбунов В.А., Титов Л.П.</i>	305
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПОЛИО- И НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ПРОТЕКАЮЩИХ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА У ДЕТЕЙ <i>Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Ухова И.Ф., Ясинская Л.И., Ермолович М.А., Семейко Г.В.</i>	308
ДОСТИЖЕНИЯ В ЭЛИМИНАЦИИ КРАСНУХИ <i>Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А.</i>	310

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЭНДЕМИЧНАЯ ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ПАРОТИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ? <i>Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А., Шиманович В.П.</i>	313
МОНИТОРИНГ ЦИРКУЛЯЦИИ ПОЛИОВИРУСОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В УСЛОВИЯХ ПЕРЕХОДА НА ИНАКТИВИРОВАННУЮ ПОЛИОВАКЦИНУ <i>Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А., Ухова И.Ф., Самойлович Е.О.</i>	316
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТСУТСТВИЯ ЭНДЕМИЧНОЙ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА КОРИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю.</i>	319
ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АДЕНОВИРУСОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК <i>Тимошичева Т.А., Амосова И.В., Бузицкая Ж.В., Львов Н.И.</i>	321
НАДЗОР ЗА ОСТРЫМИ ВЯЛЫМИ ПАРАЛИЧАМИ У ДЕТЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НОВОГО АЛГОРИТМА ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В БЕЛАРУСИ В 2016 г. <i>Ухова И.Ф., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю.</i>	324
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВРЕМЕННОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ <i>Чистенко Г.Н.</i>	327
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	331

Научное издание

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ
ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

Сборник научных трудов
Основан в 2008 году
Выпуск 10

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. Носова, Т.А. Аблова

Компьютерная верстка
Д.П. Синявского

Минимальные системные требования:
РС не ниже класса Prntium II;
32 Mb RAM; свободное место на HDD 16 Mb;
Adobe Reader;
Дисковод DVD-ROM