

**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 12

Минск
2019

Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / С56 М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. В.А. Горбунова. — Минск: СтройМедиаПроект, 2019. — Вып. 12. — 260 с., 50 ил., 39 табл.

ISBN 978-985-7172-25-2

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 практических учреждений системы здравоохранения.

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

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

Редакционная коллегия:

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

Редакционный совет:

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

Рецензенты:

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

ISBN 978-985-7172-25-2

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии», 2019
© Государственное предприятие
«СтройМедиаПроект», 2019

**РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ В СИСТЕМЕ ДИАГНОСТИКИ И
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СЛЕЖЕНИЯ ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ**

*¹Горбунов В.А., ¹Дронина А.М., ¹Носова Е.С., ¹Виринская А.С., ¹Петкевич А.С.,
²Карабан И.А., ²Филонюк В.А., ²Жукова Н.П.*

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Республика 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 и молекулярно-биологического мониторинга инфекционных заболеваний, имеющих медико-социальную значимость.

1. Научная деятельность. Основные задачи Центра реализуются в рамках государственных научно-технических программ (ГНТП), государственных (ГП), отраслевых (ОНТП), Белорусского фонда фундаментальных исследований и других программ.

В 2019 г. выполнялись задания НИР/НИОКТР в рамках 9 научных и научно-технических программ: ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи» подпрограмма «Инфекции и биологическая безопасность», в других программах: в рамках Плана научных исследований и разработок общегосударственного отраслевого назначения, направленных на научно-техническое обеспечение деятельности Министерства здравоохранения Республики Беларусь; ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи» подпрограмма «Трансплантация клеток, тканей и органов» и подпрограмма «Внутренние болезни»; ГП «Научоемкие технологии и техника» на 2016-2020 гг. (раздел 5 «Медицинские биотехнологии») подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии-2020»; ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» на 2016-2018 гг. подпрограмма 2 «Диагностика и терапия заболеваний»; ОНТП «Здоровье и среда обитания»; Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований; научно-исследовательская работа по договору с РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; международный договор с Национальным фондом Центров по контролю и профилактике заболеваний (ВОЗ).

В 2016 г. учёными института выполнялось 47 научно-исследовательских работ, в 2019 г. – 58.

В период 2012-2019 гг. Центр являлся и является головной организацией-исполнителем подпрограмм: «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», 2011-2015 гг.; «Инфекции и биологическая безопасность» ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи», 2016-2020 гг. В рамках подпрограммы «Инфекции и биологическая безопасность» ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи», 2016-2020 гг. в 2019 г. выполнялось 24 заданий НИОК(Т)Р. Научные исследования в рамках подпрограммы выполняются в следующих направлениях: нормативно-методическое и технологическое обеспечение эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями, устойчивостью к противомикробным лекарственным средствам и системы биологиче-

ской безопасности, изделия медицинского назначения для диагностики инфекционных и иммунных заболеваний на основе использования геномных, протеомных и биоинформационных технологий, современные методы, средства и подходы к профилактике и этиопатогенетической (химио- и иммуно-) терапии инфекционных и иммунных заболеваний, научно-организационное сопровождение подпрограммы.

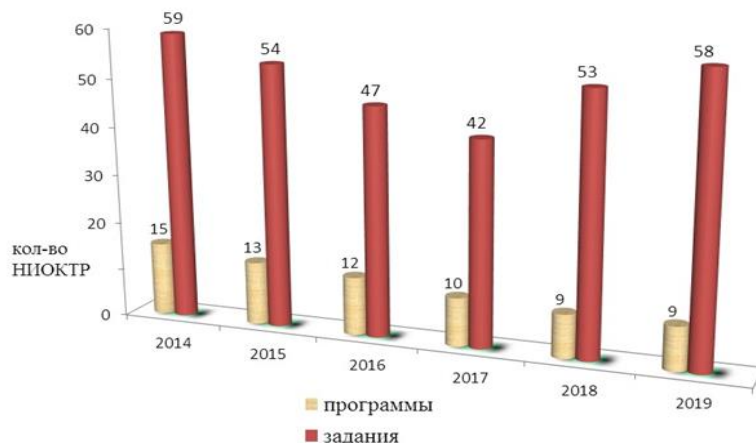


Рисунок – Динамика выполнения заданий НИОКТР в период 2014-2019 гг.

Целью подпрограммы является научно-техническое обеспечение эпидемиологического надзора, направленного на предупреждение возникновения и распространение 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 центре сформирован комплекс приоритетных фундаментальных и теоретических исследований по следующим направлениям: грипп и гриппоподобные заболевания, вакциноуправляемые инфекции, острые вирусные кишечные инфекции, природно-очаговые и особо опасные инфекции, ВИЧ-инфекция и парентеральные гепатиты, бактериальные инфекции, антибиотикорезистентность, клеточные биотехнологии.

Наиболее значимы результаты научной и научно-практической деятельности по следующим направлениям.

Грипп и гриппоподобные заболевания. Усовершенствована система мониторинга гриппа и гриппоподобных заболеваний. Определена этиологическая структура возбудителей тяжелых острых респираторных инфекций. Получены новые знания о циркулирующих в стране респираторных вирусах: РС-вирусе, метапневмовирусе, вирусах парагриппа 1-4 типов, рино-, адено-, бокавирусах, респираторных коронавирусах 229Е, NL63, BetaCoV1, HKU1, определяющих эпидемический процесс на территории Республики Беларусь в эпидемический и межэпидемический сезоны. Проведен анализ эпидемических штаммов вирусов гриппа, выделенных на территории Республики Беларусь в период с 2012-2018 гг. (научное руководство к.м.н., доцента Грибковой Н.В., к.м.н. Шмелевой Н.П.) [1, 2].

Вакциноуправляемые инфекции. Усовершенствована система молекулярно-эпидемиологического и сероэпидемиологического мониторинга вакциноуправляемых инфекций в Республике Беларусь путем разработки и внедрения новых методов диагностики и генетического анализа возбудителя (корь, краснуха, эпидемический паротит, дифтерия, полиомиелит, ротавирусная инфекция) и создания новых дифференциально-диагностических тест-систем (коклюш, паракклюш, парвовирусная инфекция).

Разработана комплексная технология дифференциальной диагностики заболеваний с синдромом острого вялого паралича (ОВП) у детей, получена генетическая характеристика выделенных вирусных агентов, создана база данных по заболеваниям, сопровождающимся синдромом ОВП. усовершенствован молекулярно-эпидемиологический надзор за циркуляцией полиовирусов среди детей и в объектах окружающей среды и установлена этиологическая структура заболеваний с синдромом ОВП. Проведено молекулярно-генетическое изучение и установлен генотип возбудителя для всех цепочек передачи и единичных случаев кори, зарегистрированных в Беларуси. Определен спектр и установлена роль вирусных агентов в этиологии острых экзантемных заболеваний (научное руководство д.м.н., профессора Самойлович Е.О.) [3-6].

Острые вирусные кишечные инфекции. Разработана и внедрена в практику система молекулярно-эпидемиологического контроля циркуляции кишечных вирусов среди населения и во внешнесредовом резервуаре. На основе достижений в области медицинских биотехнологий создана и производится линейка новых современных диагностических и санитарно-вирусологических изделий, позволяющих в течение нескольких часов осуществить этиологическую расшифровку широкого круга социально-значимых вирусных инфекций, в том числе ранее недиагностируемых в Беларуси, а также оценить качество воды и пищевых продуктов по вирусологическим показателям. Разработана и внедрена система молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителей норовирусной инфекции, изучена циркуляция генотипов на территории республики, установлен значительный вклад норовирусов в заболеваемость вирусными ОКИ, разработан алгоритм лабораторной диагностики норовирусной инфекции (научное руководство д.м.н., профессора Амвросьевой Т.В.) [7, 8].

ВИЧ-инфекция и парентеральные гепатиты. Разработана и внедрена в практику здравоохранения система молекулярно-эпидемиологического слежения за ВИЧ/СПИД, парентеральными гепатитами В и С, в том числе за лекарственно устойчивыми штаммами вирусов. Разработан метод проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга циркуляции разных субтипов ВИЧ в Беларуси. Определены основные генотипы вируса гепатита В, циркулирующие в Республике Беларусь, изучены мутации, связанные с резистентностью вируса гепатита В к ламивудину и адефовиру у пациентов с хроническим гепатитом В. Разработан государственный стандартный образец и набор контрольных образцов HBs-антигена, определена распространенность HBsAg ускользающих мутаций и HBeAg негативных случаев у пациентов с хронической формой вирусного гепатита В. На основании исследований эволюции вирусов установлены направления и время заноса ВИЧ в страну (научное руководство д.м.н., профессора Еремина В.Ф., д.б.н., доцента Гасич Е.Л.) [9, 10].

Бактериальные инфекции, антибиотикорезистентность. Усовершенствована система эпидемиологического надзора за инвазивными бактериальными заболеваниями, создана национальная сеть организаций здравоохранения и лабораторий, позволяющая проводить своевременное лабораторное подтверждение случаев бактериемии и бактериального менингита, идентификацию и типирование возбудителей. Исследована фенотипическая и генотипическая резистентность инвазивных штаммов (пневмококка, нейссерий, листерий), установлены уровни чувствительности к широкому спектру антибиотиков. Установлены факторы вирулентности *Helicobacter pylori*, ассоциированные с хеликобактериозом, определено влияние полиморфизма генов врожденного и приобретенного иммунитета человека (научное руководство чл.-корр. НАН Беларуси, д.м.н., профессора Титова Л.П.) [11-13].

Природно-очаговые инфекции и особо опасные инфекции. На основании молекулярно-биологического анализа возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом, циркулирующих в природных и антропоургических очагах распространения

инфекции на территории Республики Беларусь, впервые выявлена циркуляция хантавирусов серотипа Доброва. Разработана и внедрена в практику система молекулярно-эпидемиологического слежения за инфекциями передающимися кровососущими насекомыми (клещи, комары и пр.). Разработана линейка изделий медицинского назначения для ИФА- и ПЦР-диагностики природно-очаговых и особо опасных инфекций, не имеющих аналогов в Республике Беларусь и странах ближнего зарубежья, которые позволяют поддерживать готовность к обеспечению биобезопасности страны с учетом существующих внешних угроз и осуществлению санитарно-противоэпидемических мероприятий с целью предотвращения заноса, распространения и ликвидации проявлений инфекций, потенциально опасных возникновением чрезвычайных ситуаций в здравоохранении и имеющих международное значение (научное руководство д.м.н., профессора Владыко А.С., к.м.н., доцента Красько А.Г., д.б.н., профессора Самойловой Т.И.) [14-16].

Иммунология, трансплантология и клеточные биотехнологии. Разработаны и внедрены в практику подходы для иммунотерапии злокачественных новообразований, хронических инфекций и аутоиммунных заболеваний с использованием аутологичных дендритных клеток, стволовых клеток и Т-лимфоцитов; проводится диагностика *in vitro* лекарственной аллергии и лекарственной непереносимости (научное руководство д.м.н., профессора, чл.-корр. НАН Беларуси Титова Л.П., к.м.н. Гончарова А.Е.) [17].

Разработаны современные методические подходы к диагностике вирусных осложнений у детей после трансплантации почки. Разработан алгоритм лабораторной диагностики ранее недиагностируемой в республике ВК-вирусной инфекции у реципиентов почечного трансплантата (научное руководство д.м.н., профессора Амвросьевой Т.В.).

Создан и пополняется криобанк паспортизированных линий клеток человека и животных для использования в области вирусологии, иммунологии, фармакологии, иммунофармакологии и клеточной биотехнологии (научное руководство к.м.н. Гончарова А.Е., к.б.н. Квачевой З.Б.).

Установлены противовирусные свойства более 30 000 оригинальных и известных веществ, установлены выраженные вирусингибирующие и вирулицидные свойства более 3 000 веществ в отношении возбудителей различных вирусных инфекций (д.м.н. доцент Бореко Е.И., д.м.н., профессор Полещук Н.Н., д.м.н., профессор Еремин В.Ф.).

Разработаны направления в диагностике и оптимизации лечения урогенитальной хламидийной инфекции, критерии прогнозирования индивидуальной предрасположенности к урогенитальному хламидиозу, проведена оценка эпидемиологической значимости урогенитального хламидиоза в структуре инфекций, передаваемых половым путем; оптимизированы методы диагностики, разработан экспрессный метод диагностики острой и персистентной форм хламидийной инфекции с использованием конъюгатов флуоресцентно-меченных иммуномагнитных частиц и сконструированных биосовместимых сенсорных покрытий (научное руководство д.м.н., профессора Полещука Н.Н., к.б.н. Рубаник Л.В.) [18, 19].

Разработаны высокочувствительные и специфичные подходы для выявления возбудителей при костно-суставной патологии (аваскулярном некрозе головки бедренной кости) на субклеточном, ультра- и наноструктурных уровнях. Сконструированы сенсорные покрытия для детекции патологических белковых компонентов (прионного PrP₂₇₋₃₀ белка, β -амилоидов A β 40, A β 42) в клиническом материале с целью ранней прижизненной диагностики некоторых нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера (научное руководство д.м.н., профессор Полещука Н.Н.) [20].

Важнейшие научные достижения внедрены в практику работы лабораторий санэпидслужбы всех уровней. Разработаны и апробированы в лабораториях практиче-

ского здравоохранения новые диагностические препараты, обеспечивающие потребности отечественной лабораторной службы.

2. Международное сотрудничество. Международное сотрудничество является обязательным и необходимым элементом борьбы с инфекционными заболеваниями на современном этапе. «Прозрачность» границ для микробов, глобализация и связанное с этим резкое увеличение движения товаров, миграционных потоков и скорости передвижения больших масс населения привели к тому, что заразиться какой-нибудь экзотической инфекцией можно в одной стране, заболеть в другой, и привести к эпидемическому распространению возбудителя этой инфекции – в третьей.

Все это требует выработки единых основных подходов в борьбе с инфекциями во всех странах (на политическом, законодательном, организационном, научно-техническом и других уровнях) и координацию этой деятельности между странами и в мире в целом.

Для реализации этих задач страны участвуют в различных программах (национальных, региональных, глобальных) по отдельным инфекциям или по отдельным направлениям борьбы с инфекционными заболеваниями и работают по выработанным единым международным стандартам.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в этом плане сотрудничает с Европейским региональным бюро Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и участвует в следующих международных программах по контролю инфекционных заболеваний:

- Европейская система эпиднадзора (TESSy);
- Международная программа глобальной эрадикации полиомиелита;
- Международная программы элиминации кори и краснухи в Европейском регионе;
- Европейская лабораторная рабочая группа (ELWGD) и сеть эпиднадзора за дифтерией в Европе (DIPNET);
- Глобальная сеть оповещения о вспышках болезней и ответных действий ВОЗ (WHO Global Outbreak Communications Network);
- РНПЦ эпидемиологии и микробиологии участвует также в деятельности Межгосударственного координационного Совета СНГ по проблемам внутрибольничных инфекций, мониторингу антибиотикорезистентности микроорганизмов и устойчивости к дезинфектантам.

Для реализации всех этих и других программ на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии функционируют специально созданные национальные референс-центры и лаборатории:

- Национальный центр по гриппу (НЦГ);
- Национальный референс-центр по полиомиелиту;
- 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;
- Республиканская референс-лаборатория по диагностике особо опасных, природно-очаговых и вновь возникающих инфекций;

- Региональная лаборатория ВОЗ по ротавирусной инфекции.

Национальные референс-центры и референс-лаборатории осуществляют научно-методическое руководство по выполнению на территории Республики Беларусь программ эпидемиологического надзора за соответствующими инфекциями, являются национальными корреспондентами ВОЗ.

Региональная лаборатория по ротавирусной инфекции сотрудничает также с 7 странами (Армения, Азербайджан, Грузия, Молдова, Таджикистан, Узбекистан и Украина) и координирует деятельность национальных лабораторий этих стран, входящих в состав лабораторной сети ВОЗ по ротавирусам.

В рамках выполнения других международных обязательств Республики Беларусь РНПЦ эпидемиологии и микробиологии является одним из основных исполнителей, в части касающейся биологической сферы, «Национального рамочного документа („дорожная карта“) по выполнению «Резолюции Совета Безопасности ООН 1540 (2004)».

Сотрудники Центра принимают участие в реализации «Картахенского протокола по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии» и «Будапештского договора от 28.04.1977 о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры». На базе Центра функционирует также национальный контактный пункт по «Конвенции о запрещении биологического и токсинного оружия (КБТО)».

Центр активно развивает сотрудничество с зарубежными научными учреждениями. Установлены рабочие контакты с исследовательскими организациями Российской Федерации, Украины и Казахстана. База данных зарубежных партнёров центра включает 20 организаций, что в 3 раза больше, чем было в 2013 г. В среднем за год заключается от двух до четырех соглашений. На сегодняшний день заключены соглашения о сотрудничестве в рамках обмена опытом, подготовки и обучения кадров, совместных научных исследований с ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток ФМБА России, Одесским национальным медицинским университетом, Институтом эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В. Громашевского (Украина) и др.

Вся эта и другая международная деятельность позволяет обеспечивать проведение эффективного мониторинга наиболее актуальных инфекций в нашей стране, быстро и оперативно проводить расшифровку случаев заболеваний, связанных между собой; корректно сравнивать показатели заболеваемости с аналогичными показателями соседних и других ведущих развитых государств; и, в конечном итоге, получать объективную информацию о реальной санитарно-эпидемиологической обстановке с целью текущего и долгосрочного планирования и принятия адекватных мер для реагирования страны на современные биологические угрозы.

3. Коллекционная деятельность. Для обеспечения охраны уникальности имеющегося вирусного и бактериального материала, полученного при выполнении научных исследований, на базе центра создана и успешно развивается специализированная коллекция вирусов и бактерий, патогенных для человека. Она содержит оригинальные авторские штаммы, изолированные на протяжении многих лет на территории Республики Беларусь, стран СНГ, некоторых стран Африки.

Постановлением 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» Специализированная коллекция государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» объявлена научным объектом, который со-

ставляет национальное достояние Республики Беларусь и включена в Государственный регистр информационных ресурсов 21.11.2012 № 1761203264.

В задачи Коллекции входит:

- накопление и гарантированное сохранение вирусов и бактерий, в том числе и выделенных на территории Республики Беларусь;
- хранение штаммов, подлежащих элиминации в окружающей среде;
- подбор оптимальных методов консервации и длительного хранения вирусов;
- гармонизация правил депонирования оригинальных штаммов вирусов, выделенных на территории республики Беларусь референс-штаммов, штаммов-продуцентов вакцинных и лечебных препаратов, генетически измененных штаммов вирусов;
- обеспечение международного сотрудничества и обмена информацией по вопросам выполнения Будапештского договора по депонированию и поддержанию штаммов микроорганизмов;
- обеспечение контроля трансграничного перемещения патогенных микроорганизмов.

Всего в Коллекции хранится 386 штаммов вирусов, 416 бактерий, 20 одноклеточных грибов (на 01.09.2019): вирусы семейств *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, бактерии родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Borrelia*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Francisella*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Yersinia* и другие, грибы родов *Candida*, *Stephanoascus*.

Направления научных исследований Коллекции включают пополнение коллекционного фонда штаммов микроорганизмов, патогенных для человека, циркулирующих на территории республики; оптимизацию способов длительного хранения микроорганизмов; систематизацию сведений о культурах.

В рамках решения задачи обеспечения контроля трансграничного перемещения патогенных микроорганизмов Центр принимает и рассматривает документы от заявителей для выдачи Министерством здравоохранения заключений (разрешительных документов) на ввоз, вывоз и транзит через территорию Республики Беларусь условно патогенных и патогенных генно-инженерных организмов.

4. Образовательная деятельность. Большое внимание в центре уделяется образовательной деятельности. Подготовка научных работников высшей квалификации проводится в рамках аспирантуры (формы обучения: дневная, заочная, соискательство) и докторантуры. Аспирантура открыта по специальностям: 03.02.03 «микробиология», 03.02.02 «вирусология», 14.03.09 «клиническая иммунология, аллергология», 14.02.02 «эпидемиология» медицинской и биологической отраслей науки, 14.00.10 «инфекционные болезни» медицинской отрасли науки. Докторантура открыта по специальностям 03.00.06 «вирусология», 14.02.02 «эпидемиология» медицинской и биологической отраслей науки, 14.03.09 «клиническая иммунология, аллергология», 14.00.10 «инфекционные болезни» медицинской отрасли науки. В 2014–2018 гг. завершили обучение в аспирантуре 14 соискателей, в докторантуре – 4 соискателя. В настоящее время обучаются в аспирантуре 8, в докторантуре – 3 соискателя. В течение пяти лет были успешно защищены 6 диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, из них две диссертации по двум специальностям 14.02.02 – эпидемиология и 03.02.02 – вирусология по медицинским наукам, 2 диссертации на соискание ученой степени доктора наук - по специальности 03.02.02 – вирусология по биологическим наукам и по специальности 03.02.03 – микробиология по медицинским наукам. На базе центра под научным руко-

водством ведущих специалистов выполняется 17 диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и 5 –доктора наук.

В 2019 г. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии был аккредитован Министерством образования Республики Беларусь, имеет специальное разрешение (лицензию) на право осуществления образовательной деятельности (сертификат о государственной аккредитации № 0000030, лицензия - № 02100/579), и специалисты приступили к реализации образовательных программ дополнительного образования взрослых.

В Центре проводится реализация образовательных программ повышения квалификации руководящих работников и специалистов по профилю образования «Здравоохранение» направлению образования «Профилактика, диагностика, лечение, реабилитация и организация здравоохранения», а также организуются обучающие курсы в виде тематических семинаров, стажировки на рабочих местах по наиболее актуальным направлениям эпидемиологии, микробиологии, вирусологии, паразитологии и иммунологии для руководителей и специалистов организаций здравоохранения, учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, и специалистов негосударственных организаций, осуществляющих медицинскую деятельность.

Особое внимание уделяется укреплению связей с профильными учреждениями образования. На базе Центра студенты БГУ, МГЭУ им. А.Д. Сахарова выполняют курсовые и дипломные работы, проходят производственную практику. В 2019 году впервые на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии была организована производственная практика студентов медико-профилактического факультета БГМУ по профилям субординатуры «Гигиена и эпидемиология» и «Лабораторные исследования».

5. Производственная и экспертная деятельность. Постоянно расширяется и обновляется номенклатура выпускаемых изделий. В 2019 г. разработаны и получены разрешения на серийный выпуск 10-ти новых изделий медицинского назначения (ИМН) для диагностики особо опасных вирусных инфекций, генодиагностики кишечных вирусных инфекций, коклюша, респираторных коронавирусов, протозоозов, риккетсий, легионелл, листерий, для видовой идентификации и определения чувствительности к антибиотикам грибов рода *Candida*.

Разработка и внедрение в практику здравоохранения новых диагностических средств, позволяют обеспечивать потребности страны и поставки продукции на экспорт.

В настоящее время Центр производит и поставляет 137 наименований ИМН для диагностики различных вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. Диагностические тест-системы разработаны на основе современных технологий (ПЦР, ИФА, иммуноблоттинг, методы генетической инженерии и другие). Это иммуноферментные тест-системы, иммунофлуоресцентные наборы, наборы на основе ПЦР, компоненты для ПЦР-наборов, ИФА-тест-систем, культуры клеток, питательные среды, растворы, наборы для санитарной вирусологии, для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных заболеваний, наборы и образцы для контрольных исследований. Основное требование, которое всегда выдвигалось Государственным Комитетом по науке и технологиям и основным заказчиком – Министерством здравоохранения – это соответствие продукции, выпускаемой Центром лучшим мировым аналогам. Вся выпускаемая продукция является импортозамещающей, валютосберегающей, полностью обеспечивает потребности РБ в диагностических препаратах.

Спектр препаратов, изготавливаемых Центром специально определен спецификой краевой патологии, т.е. тем перечнем основных инфекций, которые наиболее характерны и актуальны для нашей страны и которые наносят основной социальный и экономический ущерб. При этом объем выпускаемых препаратов определяется вкладом той или иной инфекции в краевую патологию (например, больше препаратов для диагностики

гепатитов, ротавирусной инфекции и меньше для клещевого энцефалита) в каждый конкретный период времени. Все препараты имеют высокое качество, высокую диагностическую чувствительность и специфичность. При их разработке использованы отечественные штаммы микроорганизмов, циркулирующие и выделенные на территории Беларуси, что повышает их диагностическую значимость и позволяет объективно оценивать реально складывающуюся эпидемиологическую ситуацию и/или состояние больных для назначения адекватного лечения и профилактики.

Разработчики в Центре работают в тесном контакте с потребителями продукции – учитывая их конкретные потребности, требования, обучая на семинарах и практических занятиях, что обеспечивает постоянное совершенствование качества поставляемой продукции, адекватное требованиям настоящего времени.

Ряд разработанных препаратов ориентирован на экспорт. Объемы экспортируемой продукции каждый год увеличиваются в среднем на 50%. За последние 5 лет в Российскую Федерацию, Украину, Казахстан 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 рамках своей деятельности Центр проводит санитарно-вирусологические исследования пищевых продуктов и воды, предрегистрационные испытания вирулицидных свойств дезинфицирующих средств, экспертизу дезинфицирующих средств, лабораторную диагностику инфекционных заболеваний по 150 наименованиям различными методами:

- генетическую лабораторную диагностику (молекулярно-генетические исследования патогенных микроорганизмов в клиническом материале от пациентов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР): хламидий, трихомонад, уреоплазм, микоплазм, гарднерелл, вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска, вируса герпеса 6 типа, вирусов гепатита В, гепатита С, ВИЧ, вируса простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр, энтеровирусов, норовирусов, астровирусов, ротавируса, парвовируса В19 и др.);

- иммунологическую лабораторную диагностику (определение антител к вирусным и бактериальным антигенам методом иммуноферментного анализа (ИФА), определение вирусных и бактериальных антигенов в реакции иммунофлюоресценции (РИФ): хламидий, трихомонад, уреоплазм, микоплазм, гарднерелл, боррелиоза (болезнь Лайма), клещевого энцефалита, гепатита В, гепатита С, ВИЧ, вируса герпеса, вируса герпес зостер, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр, аденовирусов, ротавируса, парвовируса В19, вируса краснухи, вируса кори и др.);

- микробиологическую лабораторную диагностику (бактериологические исследования мокроты, отделяемого носа и носоглотки, отделяемого конъюнктивы глаз, отделяемого половых органов, мочи, отделяемого очагов воспаления кожи, фурункулов, ран, инфильтратов, абсцессов, экссудатов, исследование микробиоциноза кишечника (на дисбактериоз) и др.);

- лабораторную диагностику кишечных паразитарных заболеваний, в том числе завозных: аскаридоз, трихоцефалёз, некатороз, анкилостомидоз, клонорхоз, описторхоз, шистосомоз, нанофитетоз, метагонимоз, парагонимоз, фасциолез, дифиллоботриоз, лямблиоз, бластоцистоз.

В Центре выполняются исследования по контролю качества иммунобиологических лекарственных средств (вакцины, анатоксины, сыворотки, иммуноглобулины, интерфероны, пробиотики, лекарственные средства на основе моноклональных антител,

аллергены и др.). Проводится апробирование методик контроля качества лекарственных средств на этапе их государственной регистрации (перерегистрации, внесении изменений в регистрационное досье).

Оснащенность и возможности Центра позволяют проводить испытания лекарственных средств и фармацевтических субстанций с использованием современных методов по следующим показателям:

- «Подлинность» (высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, иммуноферментный анализа, реакция торможения гемагглютинации, электрофорез в полиакриламидном геле, электрофорез в агарозном геле, изоэлектрическое фокусирование, абсорбционная спектрофотометрия, флуориметрия, биологический метод с использованием культуры клеток);

- «Стерильность» (методы мембранной фильтрации и прямого посева);

- «Бактериальные эндотоксины» (гель-тромб метод, хромогенно-кинетический метод);

- «Активность» (высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализа, реакция торможения гемагглютинации, электрофорез в полиакриламидном геле, электрофорез в агарозном геле, изоэлектрическое фокусирование, абсорбционная спектрофотометрия, флуориметрия, метод одиночной радиальной иммунодиффузии, биологический метод с использованием культуры клеток);

- «Количественное определение» (высокоэффективная жидкостная хроматография, абсорбционная спектрофотометрия, флуориметрия, электрофорез в полиакриламидном геле, электрофорез в агарозном геле);

- «Аномальная токсичность» (на мышах и морских свинках);

- «Пирогенность», «рН», «Цветность», «Прозрачность», «Осмоляльность», «Невидимые частицы» (определения размера частиц методом лазерной дифракции);

- «Чистота» (высокоэффективная жидкостная хроматография, абсорбционная спектрофотометрия, флуориметрия, электрофорез в полиакриламидном геле, электрофорез в агарозном геле);

- «Определение белка» (абсорбционная спектрофотометрия, флуориметрия);

- «Распадаемость», «Молекулярно-массовое распределение» (эксклюзионная хроматография).

Разработки Центра защищены патентами на изобретения. За последние 20 лет оформлено 88 патентов (из них 3 патента за период 2014-2019 гг.), из них 87 – Республики Беларусь, 1 патент – совместно с Российской Федерацией, 3 патента – на полезную модель. В настоящее время делопроизводство ведется по 3 заявкам на изобретения Республики Беларусь. Зарегистрировано 2 товарных знака.

За большой личный вклад в развитие здравоохранения, высокий профессионализм, научные разработки сотрудники центра в период 2015-2019 гг. были отмечены:

в 2015 г. Почетной грамотой Министерства здравоохранения Республики Беларусь награждены: к.м.н. доцент Красько А.Г., к.б.н. Семижон П.А.;

в 2016 г. Почетной грамотой Министерства здравоохранения Республики Беларусь награждены: к.б.н. Янович О.О., к.м.н. Шмелева Н.П., к.м.н. Носова Е.С.; Знаком «Отличник здравоохранения Республики Беларусь» награждены: к.б.н. Поклонская Н.В., к.б.н. Свирчевская Е.Ю., Богуш З.Ф.; Почетной грамотой Совета Министров Республики Беларусь награждена д.м.н., профессор Амвросьева Т.В.; Почетной грамотой Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь награждена д.м.н., профессор Амвросьева Т.В.; Почетной грамотой Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь награждена д.б.н., профессор Самойлова Т.И.; Почетной грамотой Национальной академии наук Республики Беларусь награжден д.м.н., про-

фессор Владыко А.С.; обладателем стипендии Президента Республики Беларусь аспирантам в 2016 году являлась Романова И.В.;

в 2017 г. Почетной грамотой Министерства здравоохранения Республики Беларусь награждена к.б.н. Семейко Г.В.; Знаком «Отличник здравоохранения Республики Беларусь» награжден к.м.н., доцент Красько А.Г.; Государственной наградой Республики Беларусь Орденом Почёта награжден чл.-корр. НАН Беларуси, д.м.н., профессор Титов Л.П.;

в 2018 г. Почетной грамотой Министерства здравоохранения Республики Беларусь награждены к.б.н. Рубаник Л.В., Казинец О.Н.;

в 2019 г. Почетной грамотой Министерства здравоохранения Республики Беларусь награжден д.м.н., профессор Полещук Н.Н.; Знаком «Отличник здравоохранения Республики Беларусь» награждена Верещако Н.С.; к.б.н. Антонец Н.Г. является лауреатом гранта Президента Республики Беларусь в области науки.

6. Перспективы. Перспективными направлениями развития научно-исследовательской, инновационной, научно-методической деятельности РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в ближайшее время являются следующие.

1. Разработка программ молекулярно-эпидемиологического слежения за инфекционными болезнями человека в соответствии с международными стандартами.

2. Поддержание и совершенствование молекулярно-эпидемиологического мониторинга инфекций, традиционно управляемых средствами вакцинопрофилактики, и новых инфекций, внедряемых в национальный календарь профилактических прививок.

3. Проведение страновой оценки бремени болезней, связанных с сезонным гриппом, которая позволит получить данные, необходимые для принятия решений по распределению ресурсов в области здравоохранения, а также повысить уровень охвата вакцинацией против сезонного гриппа.

4. Разработка и внедрение эффективного алгоритма оценки риска здоровью, ассоциированного с вирусной контаминацией питьевой воды.

5. Поддержание и совершенствование системы молекулярно-эпидемиологического слежения за резистентностью ВИЧ, вирусов гепатитов В и С в условиях широкого охвата лечением; создание новых диагностических средств и методов оказания медицинской помощи с целью предотвращения распространения парентеральных вирусных инфекций и достижения элиминации этих вирусов к 2030 году.

6. Молекулярно-генетические исследования возбудителей гнойно-септических инфекций и инвазивных бактериальных заболеваний на основе мультилокусного и полногеномного секвенирования геномов, а также установить доминирующие сиквен-типы и клональные комплексы микроорганизмов для выявления путей распространения резистентности.

7. Изучение вклада природно-очаговых, вновь возникающих и возвращающихся (эмерджентных) инфекций, в том числе особо опасных и малоизученных инфекций в формирование этиологической структуры инфекционных заболеваний человека, разработка новых методов диагностики на основе современных технологий экспресс-диагностики, в том числе полногеномного секвенирования, хромато-масс-спектрометрии, иммунохроматографии.

8. Разработка и совершенствование иммуно- и молекулярно-биологических диагностических препаратов и их компонентов для выявления возбудителей особо опасных (Ласса, Марбург, Эбола) и других вирусных и бактериальных инфекций (лимфоцитарный хориоменингит, клещевой энцефалит, Западный Нил, ККГЛ, ГЛПС, иерсиниозы, лептоспироз, лихорадка денге, гепатит С и другие).

9. Разработка и внедрение в практику передовых технологий и методов дифференциальной количественной генодиагностики, профилактики и лечения клинически

значимых для детей-реципиентов гемопоэтических стволовых клеток вирусных инфекций, создание новых диагностических средств.

10. Получение и использование поливалентных мозаичных иммуногенов в составе экспрессирующих систем доставки в профессиональные антиген презентующие дендритные клетки для иммунотерапии вирусных и онкологических заболеваний.

11. Разработка технологии получения рекомбинантных аллергенов с использованием методов генетической инженерии и их применение в диагностике и иммунотерапии аллергических заболеваний.

12. Исследования в области диагностики прионных заболеваний человека и изучения этиопатогенетических основ редких нейродегенеративных заболеваний.

В целом, научно-исследовательская, инновационная, научно-методическая и координационная деятельность Центра, как головного научно-практического учреждения по проблеме контроля инфекционных заболеваний, направлена на поддержание устойчивого санитарно-эпидемического благополучия в нашей стране, защиту населения и санитарную охрану ее территории, и обеспечение, таким образом, необходимого уровня биологической безопасности, как составного элемента национальной безопасности Республики Беларусь.

Литература

1. Атипичные возбудители у детей с внебольничной пневмонией / Н.П. Шмелёва, Н.В. Сивец, Т.П. Лапо, О.Н. Романова О.Ф. Романовская // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: материалы XI Ежегодного Всерос. конгресса по инфекционным болезням с междунар. участием. – М., 2019. – С. 232.

2. Эпидемиологические аспекты коронавирусной инфекции в Республике Беларусь / Н.В. Сивец, Н.П. Шмелёва, Т.П. Лапо, Н.В. Грибкова // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: материалы XI Ежегодного Всерос. конгресса по инфекционным болезням с междунар. участием. – М., 2019. – С. 185

3. Гузовская, Т.С. Правовые основы вакцинопрофилактики / Т.С. Гузовская, А.М. Дронина // Мир медицины. – 2018. – № 8. – С. 16-18.

4. Ермолович, М.А. Эпидемический процесс парвовирусной инфекции в возрастных группах / М.А. Ермолович, А.М. Дронина, Е.О. Самойлович // Мед. журн. – 2017. – № 4. – С. 51-55.

5. Ермолович, М.А. Генетические варианты парвовируса В19, циркулирующие в Беларуси в течение эпидемического цикла инфекции (2005-2016) / М.А. Ермолович, Г.В. Семейко, Е.О. Самойлович // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – № 1. – С. 35-45.

6. Популяционный иммунитет к дифтерии и столбняку в Республике Беларусь в условиях многолетней иммунизации / В.Л. Колодкина, Е.О. Самойлович, В.С. Мартынов, И.Н. Глинская, В.С. Высоцкая // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. – № 3. – С. 19-26.

7. Инфекционный статус детей после трансплантации почки и опыт применения этиотропного лечения вирусных осложнений / Т.В. Амвросьева, З.Ф. Богуш, Е.П. Кишкурно, С.В. Байко, А.С. Аринович, Н.В. Поклонская, А.В. Сукало // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – № 1. – С. 13-22.

8. Современные методические подходы и технологии в области санитарной вирусологии пищевых продуктов для индикации эпидемических рисков здоровью человека / Т.В. Амвросьева, О.Н. Казинец, Н.В. Поклонская, С.Н. Лозюк, Ю.А. Шилова, А.С. Аринович // Донозоология. – 2018. – № 2. – С. 15-18.

9. Еремин, В.Ф. Молекулярная эпидемиология ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь / В.Ф. Еремин, Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович // Шестая конференция по ВИЧ/СПИДу в Во-

сточной Европе и Центральной Азии, Москва, 18-20 апр. 2018 г.: сб. тез. / под ред. Д.А. Лизозова [и др.]. – М., 2018. – С. 51-52.

10. Распространенность мутаций вируса гепатита В, ассоциированных с лекарственной утойчивостью к аналогам нуклео(з)тидов в Республике Беларусь / Е.Л. Гасич, В.Ф. Еремин, А.С. Немира, М.Г. Тулинова // Молекулярная диагностика – 2018: сб. тр. междунар. науч.-практ. конф., Минск, 27-28 сент. 2018 г. / под ред. акад. РАН В.И. Покровского. – Минск: СтройМедиаПроект, 2018. – С. 267-268.

11. Тренды резистентности к антибиотикам возбудителей инвазивных бактериальных заболеваний: микробиологический мониторинг 2012-2017 гг. / Л.П. Титов, В.А. Горбунов, А.Н. Хархаль, А.В. Давыдов, Н.Н. Левшина // Здоровоохранение. – 2019. – № 7. – С. 5-16.

12. Чувствительность к антибиотикам и связь с серотипами штаммов *Streptococcus pneumoniae* у детей с острым средним отитом и острым синуситом в Беларуси / А.В. Давыдов, Л.П. Титов // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2018. – № 3. – С. 8-14.

13. Янович, О.О. Распределение факторов патогенности *H. pylori* у пациентов с гастродуоденальными заболеваниями / О.О. Янович, Л.П. Титов, М.В. Дорошко // Гепатология и гастроэнтерология. – 2018. – № 2. – С. 177-181.

14. Получение и характеристика рекомбинантных полипептидов, представляющих антигензначимые участки нуклеокапсидных белков хантавирусов / Е.П. Счеслёнок, Е.Г. Фомина, П.А. Семижон, Е.Е. Григорьева, Т.В. Школина, А.С. Владыко, Т.К. Дзагурова, А.А. Ишмухаметов, Е.А. Ткаченко // Здоровоохранение. – 2018. – № 4. – С. 16-21.

15. Самойлова, Т.И. Вирус Западного Нила в Республике Беларусь: монография / Т.И. Самойлова. – Минск: Медисонт, 2018. – 206 с.

16. Закономерности динамики эпидемического процесса болезни Лайма в столичном городе / А.М. Дронина, Т.С. Гузовская, О.А. Семижон, Е.С. Носова. // Воен. медицина. – 2019. – № 1. – С. 78-84.

17. Микробиологическая характеристика возбудителей респираторных инфекций, выявленных у пациентов с муковисцидозом на территории Республики Беларусь / В.А. Горбунов, В.В. Пугач, Ю.А. Шишпоренок, А.А. Аноп, В.И. Бобровникий // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2018. – № 1. – С. 56-61.

18. Капустина, Ю.М. Современные подходы к генотипированию *Chlamydia trachomatis* / Ю.М. Капустина, Л.В. Рубаник // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 112-124.

19. Многолетняя динамика заболеваемости урогенитальным трихомониазом в Республике Беларусь и проблемы лабораторной диагностики / Л.В. Рубаник, П.С. Мельник, И.Н. Глинская, А.М. Дронина, Н.Н. Полещук // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2018. – Т. 8, № 2 – С. 199-211.

20. Атомно-силовая микроскопия: конструирование биочипов для детекции и изучения поверхностной структуры инфекционных агентов на нанометровом уровне / А.Н. Асташонок, Н.Н. Полещук, Л.В. Рубаник, Г.К. Жавнерко // Медицинские новости. – 2018. – № 2. – С. 69-74.

Поступила 18.10.2019

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Обзорные сообщения

ЭПИДСИТУАЦИЯ ПО ЗАПАДНО-НИЛЬСКОЙ ИНФЕКЦИИ И ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Самойлова Т.И., Петкевич А.С., Красько А.Г., Аблова Т.А., Горбунов В.А.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Природно-очаговая Западно-Нильская инфекция (ЗНИ), вызываемая вирусом Западного Нила (ВЗН), передается в основном через укусы кровососущих комаров, в тяжелых случаях приводит к развитию неврологических осложнений и летальным исходам. Циркуляция ВЗН в природе поддерживается благодаря циклу, включающему передачу вируса между птицами и комарами. Через Республику Беларусь пролегают пути перелета птиц (Беловежская пуца и район реки Припять, Налибокская пуца, Нарочанский заповедник). В кратком обзоре приведен анализ ситуации по эпиднадзору за ЗНИ и циркуляцией вируса в республике с учетом оценки риска передачи вируса человеку на основании изучения доступных данных научной литературы, а также собственных исследований. Показано, что основную роль в циркуляции ВЗН в природных очагах на территории Беларуси играют кровососущие комары (*Culex* и *Anopheles*), в которых выявляется антиген ВЗН, и птицы, от которых выделены штаммы ВЗН. На основании проведенных исследований (выделение ВЗН, выявление антител к нему и обнаружение антигена) была составлена карта-схема распространения ВЗН в Беларуси, согласно которой вирус циркулирует на всей территории республики, особенно в южной ландшафтно-климатической зоне. В этой связи территорию республики можно отнести к зоне риска передачи ВЗН для человека, что должно вызвать настороженность со стороны органов здравоохранения и ветеринарной службы республики для усиления мероприятий по эпиднадзору за ЗНИ, включая совместные профилактические мероприятия и проведение дальнейших исследований

Ключевые слова: вирус Западного Нила, лихорадка Западного Нила, Западно-Нильская инфекция, циркуляция, эпидемиологическая ситуация, Беларусь.

Введение. Вирус западного Нила (ВЗН) впервые выделен в Африке (Уганда) в 1937 г. из крови лихорадящей больной и в последние годы привлекает внимание способностью вызывать не только спорадические случаи заболевания, но и крупные вспышки Западно-Нильской инфекции (ЗНИ), или лихорадки Западного Нила (ЛЗН) в различных странах мира [1]. Если раньше в 50-60-х гг. прошлого столетия заболевания у людей протекали в виде спорадических случаев, то с 1996 г. они стали отличаться эпидемическими вспышками, характеризующимися в основном менингитами и менингоэнцефалитами. Так, в 1996-2019 гг. такие вспышки были зарегистрированы в ряде европейских стран (Румынии, Венгрии, Греции, Италии, Израиле, и др.), а также в России, США, Канаде.

В настоящее время в странах Европы и на сопредельных с Беларусью территориях происходит активизация природных очагов ЗНИ. Подобная картина наблюдается и в нашей республике. В Беларуси циркуляция ВЗН зарегистрирована на всей территории. О существовании стойких природных очагов ЗНИ свидетельствуют многочисленные находки антител у птиц (скворцы, трясогузки, мухоловки, сизоворонки, чибисы, голуби, серые вороны, певчие дрозды и др.), диких и сельскохозяйственных животных, людей, а

также выделение ВЗН из крови лихорадящего пациента, от птиц, комаров на территории республики [2-4].

Западно-Нильская инфекция является природно-очаговой вирусной инфекцией, передающейся через укусы кровососущих насекомых, в тяжелых случаях приводящее к развитию неврологических осложнений и летальным исходам. Обычно это заболевание встречается в странах Африки, на Ближнем Востоке в Северной Америке, Западной Азии, отдельных странах Европы и соседней России.

Циркуляция ВЗН в природе поддерживается благодаря циклу, включающему передачу вируса между птицами и комарами. Основными переносчиками ВЗН считаются комары рода *Culex*. Вирус поддерживается в популяциях комаров через вертикальную передачу (от взрослых особей яйцам). Инфицирование человека чаще всего происходит в результате укусов инфицированных комаров, вирус может также передаваться при контакте с инфицированными животными, их кровью или другими тканями. Незначительная доля случаев инфицирования людей происходит при трансплантации органов, переливания крови и грудном вскармливании. Зарегистрирован один случай трансплацентарной передачи [5].

Восприимчивость человека к ВЗН высока, несмотря на преобладание бессимптомных (около 80% случаев) или легких лихорадочных форм заболевания с симптомами головной боли, боли в теле, тошноты, рвоты, иногда с кожной сыпью и увеличением лимфатических узлов. Согласно последним литературным данным, 20-30% инфицированных людей имеют симптомы от гриппоподобных до нейроинвазивных заболеваний (менингит, энцефалит или острый паралич), которые в некоторых случаях заканчиваются серьезным осложнением или даже летальным исходом с показателями 3-17%. Специфической профилактики (вакцины) против ЗНИ для человека нет. [2-4].

Природные очаги ЛЗН формируются в основном во влажных экосистемах (поймах и дельтах рек, часто затопляемых территориях). Заболеваемость ЛЗН имеет выраженную сезонность – позднее лето и осень, в период активности переносчиков вируса. Люди восприимчивы к ЛЗН независимо от возраста и пола. Чаще заболевают сельские жители, живущие по берегам озер, рек, рыбопродуктивных прудов, где имеется большое количество диких водоплавающих птиц и выплываются комары. К категориям повышенного риска заражения ЗНИ относятся также рыбаки, охотники, грибники, дачники.

В связи с тем, что природным резервуаром для ВЗН являются перелетные птицы, возможен занос ими вируса на территорию республики. Возникновение случаев ЗНИ в регионах, для которых она не характерна, связывают с определенными природными факторами (более высокой температурой воздуха, создание экологической ниши для интенсивного кормления комаров) и антропогенным влиянием человека на окружающую среду, повышающими плотность популяции переносчика вируса (например, ирригационные мероприятия). Погодные условия весны и начала лета 2019 г. (температуры выше климатической нормы) привели к раннему появлению клещей и комаров в природе, а наличие инфицированных прокормителей (мигрирующие птицы) – к инфицированию кровососущих членистоногих (комаров и клещей).

Через Республику Беларусь пролегают пути перелета птиц – по территории Брестской и Гомельской областей (Беловежская пуца и район р. Припять), и севернее – через Налибокскую пуцу и Нарочанский заповедник. На территории нашей страны, где отсутствуют географические преграды для птиц, поймы рек и болот в организованных заповедниках и национальных парках вследствие благоприятных кормовых условий и относительной безопасности служат местами скопления водно-болотных видов перелетных птиц. Эти виды останавливаются также на озерах, водохранилищах или открытых болотах.

Цель работы: проанализировать ситуацию по эпиднадзору за ЗНИ и циркуляцией вируса в республике с учетом оценки риска передачи вируса человеку на основании изучения доступных данных научной литературы, а также собственных исследований.

Эффективность эпиднадзора за ЗНИ заключается в комплексном подходе на глобальном, национальном и местном уровнях, включая надзор за состоянием здоровья людей, животных и энтомологический надзор. Весьма существенным является регулярное общение и обмен информацией между различными секторами. Проблема заключается в том, что в разных странах существует свое законодательство в области общественного здравоохранения и ветеринарных служб, и сравнительная интерпретация данных по ВЗН из разных стран затруднена. Системы эпиднадзора с разработанной инфраструктурой по сбору и анализу данных комплексного мониторинга по ВЗН (от людей и животных) на основе регулярного финансирования функционируют только в рамках проекта Erisouth Network (<http://www.episouthnetwork.org/>). Эта сеть создана между странами Средиземноморья (Юго-Восточной Европы, Северной Африки и Ближнего Востока) и является основой сотрудничества по эпидемиологическим вопросам для усиления эпиднадзора заболеваний и контроля рисков для здоровья населения посредством общения, обучения, обмена информацией и технической поддержки стран в Средиземноморском регионе. Из Юго-Восточных Европейских стран в данном проекте участвуют Албания, Босния и Герцеговина, Болгария, Греция, Испания, Италия, Кипр, Румыния, Сербия, Словения, Франция, Хорватия, Черногория. Для анализа данных по вспышкам, вызванным ВЗН в европейских странах и координации ответных мер экспертами Европейского центра контроля и профилактики болезней (ECDC) в 2013 г. был разработан специальный документ «Методическое руководство по оценке риска, связанного с вирусом Западного Нила», согласно которому определена оценка уровней рисков передачи инфекции для человека с учетом географических зон риска и показателей целого ряда различных систем надзора за ЗНИ в странах-членах ЕС (таблица) [5].

Таблица. – Уровни риска передачи ВЗН для человека с соответствующей зоной риска и используемыми показателями его определения

Соответствующая зона риска	Уровень риска	Показатели
Свободная от риска	0	Исторически не выявлена циркуляция ВЗН
Предрасположенная к риску	1	Экологические условия, подходящие для циркуляции ВЗН, но исторически циркуляция ВЗН не выявлена
Зона риска	2	Есть данные о циркуляции ВЗН в прошлом
	3a	Есть данные о циркуляции ВЗН с обнаружением в комарах и птицах во втором периоде текущего сезона (август-сентябрь-октябрь)
	3b	Есть данные о циркуляции ВЗН с обнаружением в комарах и птицах в первый период текущего сезона (май-июнь-июль)
	4	Выявлен специфический IgM к ВЗН у местных невакцинированных лошадей(и) или ВЗН выделен от местной лошади.
Пораженная зона	5	Выявлен хотя бы один случай среди людей в соответствии с подтвержденным случаем по стандартам ЕС (см. выше).

Исследования по обнаружению циркуляции ВЗН на территории Беларуси начались в конце 1960-х гг., которые позволили выявить антитела у жителей Беловежской пушчи к антигенам вируса [6].

Первым штаммом ВЗН, выделенным в Беларуси явился штамм «48-ЗН-Тремля», названный по наименованию местности (рыбхоз Тремля Петриковского района Гомельской обл.), где он был изолирован из внутренних органов скворцов в апреле 1985 г. на весеннем пролете [2-4]. Позже вирус был выделен от кровососущих комаров рода *Aedes* и из крови лихорадящего больного, была выявлена идентичность полученных изолятов между собой. Было показано, что на территории Республики Беларусь циркулирует популяция ВЗН, близкородственная африканскому варианту. Обширными иммуносерологическими исследованиями, проводимыми в период 1980-1999 гг., установлено наличие специфических антител к вирусу в крови людей (1,7-15,4%), крупного рогатого скота (0,6-5,8%), мелких диких млекопитающих (2,9-6,8%) и птиц (6,5-16,7%). Это указывает на наличие условий распространения вируса на всей территории Беларуси. Присутствие антигена ВЗН выявлено в комарах родов *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, мошках рода *Boopthora* и клещах *Ixodes ricinus*. Однако основную роль в циркуляции ВЗН, по нашему мнению, в природных очагах на территории Беларуси играют кровососущие комары и птицы, от которых выделены штаммы ВЗН. Кроме того, в комарах, синантропных видов рода *Culex*, собранных на территории Гомельской области, и рода *Anopheles* (Минская область), выявляется антиген ВЗН (22,2 и 18,2% соответственно) [2-4].

В процессе исследований по обнаружению антител к ВЗН у людей мы наблюдали случаи, при которых антитела с 4-х кратным нарастанием титров выявлялись у больных с различными диагнозами: ОРВИ, ОРЗ, острый бронхит, пневмония неясной этиологии и др. Было обращено внимание на острые лихорадочные заболевания, возникающие в весенне-летний сезон. Они начинались, как правило, остро, температура повышалась до 40°C. Все это сопровождалось сильной головной и мышечной болями, ознобом, отмечалось увеличение шейных и затылочных лимфатических узлов, у 20-50% больных регистрировалась сыпь, у части больных наблюдалась боль в горле, диарея, потеря аппетита и рвота. Инкубационный период составлял 2-6 дней. У части больных имели место серьезные менингиты неясной этиологии. Через несколько дней лихорадка проходила, и наступало выздоровление. В таких случаях, как правило, ставился диагноз ОРВИ, хотя результаты исследования парных сывороток от таких больных на грипп, парагрипп и аденовирусы были отрицательными и положительными лишь с антигеном ВЗН. Выявлено более 20 серологически подтвержденных (4-х кратное нарастание титров специфических антител к вирусу в парных сыворотках) случаев ЗНИ среди лихорадящих больных неясной этиологии в эпидемический сезон [2-4].

Не вызывает сомнений, что в Беларуси наблюдается гиподиагностика ЗНИ, которая проходит под другими диагнозами (ОРВИ, лихорадки, менингиты, менингоэнцефалиты неясной этиологии и др.). Сложившаяся ситуация связана с отсутствием настороженности и информированности врачей в отношении данного заболевания, недостаточно отлаженной диагностикой и системой мониторинга циркуляции ВЗН в стране.

В июне-июле 2019 г. в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии проведены исследования биологического материала (сыворотка крови) от лихорадящих пациентов, доставленного из лечебно-профилактических учреждений г. Минска (городская клиническая инфекционная больница, 5-я городская клиническая больница), несколькими методами – иммуноферментным анализом (ИФА) для выявления антител класса IgM, IgG и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для выявления генетического материала вируса. Данные исследования в 2-х случаях позволили подтвердить предварительный диагноз «лихорадка Западного Нила». Еще 3 случая предварительно также могут быть иденти-

фицированы как случаи заболевания ЛЗН, но требующих дополнительной дифференциации. Исследования материала от больных проводились с использованием коммерческих диагностических тест-систем, зарегистрированных в Республике Беларусь: ИФА – Euroimmun AG (ФРГ) и ПЦР – ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Российская Федерация).

В связи с активизацией циркуляции ВЗН в соседних странах и необходимостью недопущения чрезвычайной эпидситуации в Беларуси, в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии разработаны тест-системы для диагностики ЗНИ. Созданы и прошли государственную регистрацию «Диагностическая тест-система для определения антител класса М и G к вирусу Западного Нила непрямым методом флуоресцирующих антител», «Иммуноферментная тест-система для выявления антигена вируса Западного Нила в переносчиках и клиническом материале». Разработана и внедрена в практическое здравоохранение иммуноферментная тест-система для выявления IgM и IgG в сыворотках крови людей.

Следует отметить, что в последние годы эпиднадзор за ЗНИ в Беларуси осуществляется в рамках научно-исследовательских работ, что явно недостаточно для выявления реальной картины эпидситуации по данной инфекции в республике. Например, при исследовании методом ИФА биопроб от кровососущих комаров родов *Aedes* (41,9%), *Anopheles* (32,3%), *Culex* (25,8%) и мошек сем. *Simuliidae*, собранных в 2011-2013 гг., показано, что антиген ВЗН выявлялся на территории всех областей. Процент выявления положительных биопроб в 2013 г. был выше, чем в 2011 и 2012 гг. в Витебской, Могилевской, Гродненской и Брестской областях. Наибольшая динамика роста выявления антигена отмечена в Витебской (с 7,1% в 2011 г. до 16,7% в 2013 г.) и Могилевской (с 13,1% в 2011 г. до 23,1% в 2013 г.) областях. Наименьшая динамика роста отмечена в Гродненской области: с 12,5% в 2011 г. до 14,3% в 2013 г. Процент выявления положительных биопроб в Гомельской области в 2012 и 2013 гг. оставался на одном уровне (25%), но вырос по сравнению с 2011 г. – 16,7%. Что касается Минской области, то выявление антигена ВЗН в 2012 г. (15,0%) возросло по сравнению с 2011 г. (10,3%), однако в 2013 г. произошло снижение процента положительных биопроб до 9,7%. Выявление антигена ВЗН в кровососущих комарах на территории всей республики увеличилось с 12,8% в 2011 г. до 17,9% в 2013 г. [2-4]. Если рассматривать зараженность комаров по родам, то наибольший процент содержания антигена вируса отмечен у комаров р. *Anopheles* – 24,1% (34 положительных биопробы из 141 исследованных). Процент положительных биопроб кровососущих комаров р. *Aedes* составил 8,7% (16 из 183), а р. *Culex* – 15,0% (17 из 113).

Проведенные исследования кровососущих комаров и мошек показали, что отмечается рост зараженности кровососущих комаров, собранных в 2013 г. по сравнению с зараженностью переносчиков, собранных в 2011 г. в целом по республике и на территории большинства областей. Антиген ВЗН обнаруживается в кровососущих комарах всех трех исследуемых родов (*Aedes*, *Anopheles* и *Culex*) и мошках.

На основании проведенных исследований (выделение ВЗН, выявление антител к нему и обнаружение антигена) была составлена карта-схема распространения ВЗН в Беларуси, согласно которой вирус циркулирует на всей территории республики, особенно в южной ландшафтно-климатической зоне.

Учитывая, что синантропные и полусинантропные роды комаров *Anopheles* и *Culex* обитают поблизости с жильем человека и постоянно соприкасаются с ним, инфицированные ВЗН переносчики создают угрозу заражения людей этим возбудителем.

Заключение. Таким образом, на основании вышеизложенного территорию Республики Беларусь можно отнести к зоне риска передачи ВЗН для человека уровня 3b в соот-

ветствии с методическим руководством экспертов ECDC, т.е. получены данные о циркуляции ВЗН с обнаружением в комарах и птицах в первый период текущего сезона (май-июнь-июль) (таблица). Это должно вызвать настороженность со стороны органов здравоохранения и ветеринарной службы республики для усиления мероприятий по эпидемиологическому надзору за ЗНИ, включая совместные профилактические мероприятия и проведение дальнейших исследований.

Расширение географического распространения ВЗН в Европе и остальном мире, увеличение числа вспышек заболевания среди людей, потенциальное появление штаммов с повышенной вирулентностью, а также ограничения современных диагностических тестов по выявлению новых и вновь возникающих геновариантов ВЗН вызывает озабоченность органов здравоохранения всех стран мира. В настоящее время для стран-членов ЕС разработано специальное методическое руководство, согласно которому определена оценка уровней рисков передачи инфекции для человека с учетом географических зон риска и показателей целого ряда различных систем надзора за ЗНИ.

Учитывая, что Республика Беларусь относится к зоне риска передачи ВЗН человеку и расположена в центре Европы, через которую проходят высокие миграционные потоки людей и миграционные перелеты птиц, с учетом опыта соседних стран и, особенно, стран ЕС и Российской Федерации, назрела необходимость поэтапной разработки системы надзора данной инфекции, а именно:

- внедрить в практику здравоохранения и ветеринарной службы разработанные отечественные диагностические тест-системы на основе ИФА и НМФА и разрабатываемую ПЦР тест-систему;

- внести учет заболеваемости в официальные статистические формы в случае подтвержденного диагноза;

- оценить распространенность заболевания среди людей и животных (в первую очередь, среди лошадей);

- организовать обучение отечественных специалистов на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, в профильных учреждениях Российской Федерации или странах ЕС и, наконец,

- определить национальный референс-центр по данному заболеванию с целью координации и согласованности возможных дальнейших действий по контролю ЗНИ в европейском регионе.

Литература

1. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda / K.C. Smithburn [et al.] // Amer. J. Trop. Med. Hyg. – 1940. – Vol. 20. – P. 471-492.

2. Инфицированность кровососущих комаров и мошек вирусом Западного Нила на территории Республики Беларусь в 2011-2013 гг. / А.А. Согдаева [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь; РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. проф. Л.П. Титова. – Минск: ГУ РНМБ, 2014. – Вып. 7. – С. 95-98.

3. Самойлова, Т.И. Эпидемиологическая ситуация по арбовирусным инфекциям в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова // Здравоохранение. – 2014. – № 12. – С. 13-19.

4. Samoiloва, T.I. Virologic and serologic investigations of West Nile virus circulation in Belarus / T.I. Samoiloва, V.I. Votiaikov, L.P. Titov // Cent. Eur. J. Public Health. – 2003. – Vol. 11, No. 2. – P. 55-62.

5. European Centre for Disease Prevention and Control. West Nile Virus Risk Assessment Tool: ECDC Technical Report. – Stockholm: ECDC, 2013. – 24 p.

6. Результаты серологической разведки на арбовирусы в Беловежской пуше (Белорусская ССР) / Д.К. Львов [и др.] // Арбовирусы: материалы пробл. комиссии АМН СССР «Полиомиелит и вирусные энцефалиты». – М., 1967. – Вып. 2. – С. 90-91.

EPIDEMIOLOGY OF WEST NILE VIRUS INFECTION AND THE VIRUS CIRCULATION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Samoilova T.I., Petkevich A.S., Krasko A.G., Ablova T.A., Gorbunov V.A.

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

The natural focal West Nile virus (WNV) infection is transmitted mainly through the bites of blood-sucking mosquitoes, and in severe cases leads to the development of neurological complications and deaths. WNV circulation in nature is supported by a cycle involving the transmission of the virus between birds and mosquitoes. Bird flight routes run through the Republic of Belarus (Belovezhskaya Pushcha and the area of the Pripyat River, Nalibokskaya Pushcha, Narochansky Nature Reserve). The brief review provides the analysis of the WNV infection surveillance and virus circulation in the republic, taking into account the risk assessment for WNV transmission to humans based on the study of available scientific literature data, as well as our own research. It was shown that blood-sucking mosquitoes (*Culex* and *Anopheles*) in which WNV antigen is detected and birds from which WNV strains are isolated play the main role in the WNV circulation in natural foci on the territory of Belarus. Based on the studies the map on the WNV distribution in Belarus has been developed, according to which the virus circulates throughout the republic, especially in the southern landscape-climatic zone.

In this regard, the territory of Belarus can be attributed to the risk zone for WNV transmission to humans. This should cause caution on the part of the health authorities and the veterinary service of the republic to strengthen surveillance activities for WNV infection, including joint preventive measures and further research.

Keywords: West Nile virus, West Nile fever, infection, circulation, epidemiological situation, Belarus.

Поступила 27.09.2019

Оригинальные исследования

АЛГОРИТМ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РАССЛЕДОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КИШЕЧНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

**Учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь*

Резюме. Статья посвящена актуальной для здравоохранения проблеме инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). В ней представлены результаты молекулярно-эпидемиологических исследований, направленных на изучение вирусной контаминации объектов госпитальной среды (ОГС) возбудителями вирусных острых кишечных инфекций (рота-, норо-, адено-, астро-, сапо- и энтеровирусами) в учреждениях здравоохранения и установление ее связи с инфекциями пациентов, находящихся на лечении в данных учреждениях. Полученные результаты свидетельствуют о высокой частоте контаминации ОГС детского (43,8%) и взрослого (22,8%) инфекционных стационаров и наличии ассоциативной связи регистрируемой кишечной заболеваемости в инфекционных стационарах со спектром кишечных вирусов-контаминантов ОГС этих учреждений. В ходе проведенного молекулярно-эпидемиологического расследования в 2 эпизодах с подозрением на ИСМП установлена высокая степень генетического сходства (не менее 99,0%) вирусов, выявленных у пациентов и в госпитальной среде (аденовирусов – в условиях детского инфекционного стационара и ротавирусов – в условиях взрослого инфекционного стационара), что указывало на ОГС – как возможные факторы передачи кишечных вирусных инфекций.

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

Введение. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), регулярно регистрируются и продолжают оставаться актуальной проблемой здравоохранения в мировом масштабе, затрагивая практически все страны. Общим критерием для отнесения случаев инфекций к ИСМП является непосредственная связь их возникновения с оказанием медицинской помощи (лечением, диагностическими исследованиями, иммунизацией и т.д.).

Возбудителями ИСМП является довольно широкий и разнообразный круг инфекционных патогенов. На сегодняшний день ведущая роль вирусных патогенов в формировании основной массы заболеваемости ИСМП становится все более очевидной. Это относится и к кишечным инфекциям, которые занимают особое место в структуре заболеваемости ИСМП с точки зрения их социальной значимости, обусловленной массовостью, частотой встречаемости и скоростью распространения. Так, по данным зарубежных исследователей среди возбудителей диарейных ИСМП доля вирусов составляет 91-94%. Особый интерес из возбудителей кишечных вирусных ИСМП представляют ротавирусы (РВ) и норовирусы (НоВ). По заключению экспертов ВОЗ РВ вызывают от 50 до 60% всех связанных с ИСМП диарей у детей в возрасте до 24 месяцев, часть из которых заканчиваются летальным исходом. Частота ИСМП, вызванных НоВ, составляет 27-32%.

Основными источниками кишечных вирусных ИСМП являются пациенты и медицинский персонал, основными факторами передачи – различные объекты госпитальной среды (ОГС). Учитывая то обстоятельство, что в основной своей массе кишечные вирусные инфекции (КВИ) являются вакцинонеуправляемыми и для их лечения отсутствуют этиотропные противовирусные средства, пресечение пути передачи возбудителей через ОГС является одним из эффективных способов борьбы с ними. Расследование случаев ИСМП с установлением причинно-следственных связей их возникновения и развития имеет ряд методических особенностей и сложностей. Прежде всего, это касается санитарно-вирусологических работ, требующих использования специальных высокочувствительных методов детекции и идентификации вирусного загрязнения ОГС, что связано с крайне низким содержанием детектируемых возбудителей в исследуемом материале и необходимостью их многократного концентрирования. Кроме того, весьма сложным и трудоемким является этап установления связи между возникшим случаем инфекции и выявленным фактом вирусной контаминации госпитальной среды, который предполагает, кроме тщательного эпидемиологического расследования, проведение молекулярно-генетического и биоинформационного анализа кишечных вирусов, идентифицированных в пробах биологического материала и смывах с ОГС. Именно данный комплекс современных молекулярно-эпидемиологических исследований должен лежать в основе эффективного эпиднадзора за кишечными вирусными ИСМП – как важной профилактической меры, направленной на обеспечение благоприятной эпидситуации в госпитальной среде.

Руководствуясь данными зарубежной литературы и результатами собственных пилотных исследований по изучению контаминации кишечными вирусными агентами поверхностей ОГС [1-3], нами был разработан алгоритм действий, регламентирующий осуществление молекулярно-эпидемиологического расследования случаев кишечных вирусных ИСМП на уровне пациента и эпидемически значимых ОГС. Данный алгоритм устанавливает порядок, последовательность этапов, схему и методы осуществления генодиагностических, санитарно-вирусологических и молекулярно-генетических исследований, а также показатели и критерии оценки и интерпретации полученных результатов [4].

Настоящая работа посвящена обобщению и анализу результатов использования разработанного алгоритма молекулярно-эпидемиологического расследования случаев предполагаемых кишечных вирусных ИСМП в условиях госпитальной среды.

Материалы и методы исследования. Отобрано и исследовано на предмет выявления РВ, НоВ, энтеровирусов (ЭВ), аденовирусов (АдВ), астровирусов (АсВ), саповирусов (СаВ) 446 смывов с поверхностей ОГС (210 – детского инфекционного стационара, 184 – взрослого инфекционного стационара, 52 – педиатрических отделений детской клинической больницы крупного города страны).

Исследовано 67 образцов фекалий, 62 из которых получены от пациентов детского и взрослого инфекционных стационаров с клиническими диагнозами «острый гастрит», «острый гастроэнтерит», «острый энтерит», «острый гастроэнтероколит», «острый энтероколит», «острая кишечная инфекция» и 5 образцов от пациентов педиатрических отделений детской клинической больницы.

Отбор и пробоподготовку смывов с ОГС и образцов фекалий для исследований методом ПЦР выполняли согласно действующим в Республике Беларусь инструктивным документам [5, 6]. Выделение ДНК/РНК кишечных вирусов и индикацию РВ группы А, НоВ 2-ой геногруппы, АсВ, АдВ группы F проводили коммерческими наборами производства Амплисенс (Россия) согласно инструкциям по применению. Выявление РНК ЭВ осуществляли методом ОТ-ПЦР с использованием коммерческого набора производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Беларусь) в соответствии с инструкцией по

применению. Индикацию СаВ проводили методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров и зонда, синтезированных фирмой PrimeTech (Беларусь) и компонентов реакционной смеси производства АртБиоТех (Беларусь) [7].

Накопления нуклеотидных последовательностей обнаруженных вирусов для их секвенирования осуществляли с помощью Diamant HF ДНК полимеразы, буфера (ГНУ «Институт микробиологии НАН РБ», Беларусь), амплификацию - с применением взятых из литературных источников праймеров, синтезированных фирмой PrimeTech (Беларусь) [8-10]. Реакцию секвенирования проводили с использованием набора производства Beckman coulter (США), детекцию осуществляли на приборе SEQ 8 000 (Beckman coulter, США). Анализ результатов выполняли с использованием программного продукта MEGA6. Молекулярное типирование проводили с помощью программного продукта Norovirus Genotyping Tool Ver 1.0 и BLAST [11].

Результаты исследования и обсуждение. Согласно разработанному алгоритму, для отнесения расследуемой кишечной заболеваемости к ИСПМ руководствовались совокупностью следующих данных: эпидемиологические доказательства, свидетельствующие о возможности развития ИСПМ, полученные в ходе классического эпидемиологического расследования; регистрация у пациента(ов) клинических симптомов кишечной вирусной инфекции в виде острого гастрита, гастроэнтерита, энтерита и других поражений желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся диареей и симптомами интоксикации, которые появились спустя 24-48 часов и более после их госпитализации, а также у медицинского персонала в процессе осуществляемой им деятельности; лабораторное подтверждение вирусной этиологии кишечной инфекции и установление ее возбудителя(ей); лабораторное подтверждение контаминации объектов госпитальной среды возбудителем(ями) регистрируемой заболеваемости кишечной вирусной инфекцией; молекулярно-эпидемиологическое подтверждение высокой степени генетического сходства (не менее 99,0%) кишечных вирусов, выявленных в биологическом и санитарно-вирусологическом материалах.

В ходе практического использования данного алгоритма в условиях госпитальной среды (детский и взрослый инфекционные стационары, педиатрические отделения детской клинической больницы) проводились санитарно-вирусологические исследования ОГС на предмет установления их контаминации возбудителями КВИ и выявления наиболее эпидемически значимых в отношении риска возникновения кишечных вирусных ИСПМ. Параллельно осуществлялись исследования биологического материала пациентов (фекалии) для установления этиологии регистрируемой у них КВИ, предположительно связанной с оказанием медицинской помощи. Если по результатам молекулярного типирования была установлена принадлежность кишечного(ых) вируса(ов), выявленного(ых) в фекалиях пациента и в смывах с ОГС к одному генотипу/геноварианту, проводилось расследование на предмет установления молекулярно-эпидемиологической связи между случаем возникновения КВИ и фактом загрязнения госпитальной среды возбудителями с использованием биоинформационного анализа полученных результатов.

В исследованиях был задействован достаточно широкий перечень ОГС: ручки и поверхности дверей, краны водопроводные и умывальники, выключатели, поверхности стен, пола и плинтусов в предбоксниках, санитарных комнатах и палатах пациентов, бачки для сброса использованного постельного белья, ведра для мусора, ручки и поверхности шкафов для одежды, тумбочки прикроватные, постельное белье, ножки и спинки кроватей пациентов, подоконники, столы обеденные, стулья, батареи, игрушки пациентов, гаджеты, штативы капельниц, руки пациентов и их родителей, медицинского персонала и др. Санитарно-вирусологические исследования смывов с ОГС осуществлялись на предмет установления наличия или отсутствия их вирусной контаминации генетическим

материалом кишечных вирусов – РВ, НоВ, АдВ, АсВ, ЭВ и СаВ. Параллельно на аналогичный спектр вирусных патогенов анализировались образцы фекалий пациентов, находящихся в этот период на стационарном лечении.

Анализ выполненных в учреждениях здравоохранения санитарно-вирусологических исследований показал достаточно выраженную вирусную контаминацию ОГС, частота которой составила 31,2% (139 позитивных смыва из 446 исследованных). При этом генетический материал кишечных вирусов чаще обнаруживался в детском инфекционном стационаре (43,8%, 92 позитивных смыва из 210 исследованных), чем во взрослом (22,8%, 42 позитивных из 184 исследованных) и в педиатрических отделениях детской клинической больницы (9,6%, 5 позитивных из 52 исследованных).

В перечень обнаруженных кишечных вирусов-контаминантов ОГС вошли РВ, НоВ, АдВ, ЭВ и СаВ. Положительные результаты в отношении АсВ отсутствовали. Среди выявленных агентов доминировали РВ. Частота их регистрации составила 22,4%. Присутствие ДНК АдВ было установлено в 9,0% исследованных проб, РНК НоВ – в 6,5%, ЭВ – в 0,7% и СаВ – в 0,2% (рисунок 1). Факты контаминации ОГС одним из детектируемых возбудителей КВИ регистрировались в 24,7% проб, двумя – в 4,9%. Смешанная контаминация была представлена следующими сочетаниями: РВ+АдВ, РВ+НоВ, НоВ+АдВ, РВ+ЭВ и НоВ+ЭВ. Одновременное выявление генетического материала 3 кишечных вирусов имело место в 1,6% проб, в которых обнаруживались следующие сочетания: РВ+НоВ+АдВ и СаВ+ЭВ+НоВ.

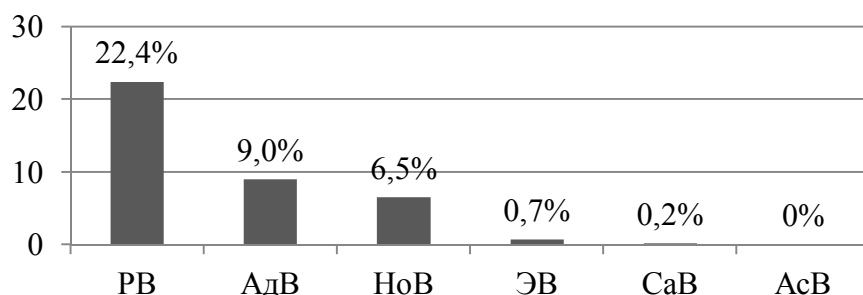


Рисунок 1. – Частота обнаружения кишечных вирусов-контаминантов ОГС в условиях госпитальной среды, %

РВ были наиболее часто обнаруживаемыми возбудителями как в условиях детского (29,5%), так и взрослого (19,6%) инфекционных стационаров (рисунок 2).

Спектр вирусов-контаминантов ОГС в детском инфекционном стационаре и детской клинической больнице был представлен РВ, АдВ и НоВ, во взрослом инфекционном стационаре этот перечень дополнили ЭВ и СаВ.

Анализ контаминированных кишечными вирусами ОГС показал, что перечень их весьма широк (таблица). Наиболее эпидемически значимыми в отношении риска возникновения кишечных вирусных ИСМП ожидаемо оказались унитазы и детские горшки, частота контаминации которых была максимальной и составила 53,5%. К доминирующим эпидемически значимым ОГС отнесены также ручки дверей (в предбоксниках, боксовых помещениях и санитарных комнатах, шкафов для одежды), уровень загрязнения которых достигал 49,2%. Незначительно ниже оказались уровни контаминации ножек кроватей пациентов (43,5%), выключателей (39,1%) и постельного белья (37,0%). Частота контаминации столов обеденных, кранов водопроводных, стульев, батарей, прикроватных тумбочек, игрушек и гаджетов, полов, подоконников и плинтусов колебалась в пределах от 33,3% до 20,0%.

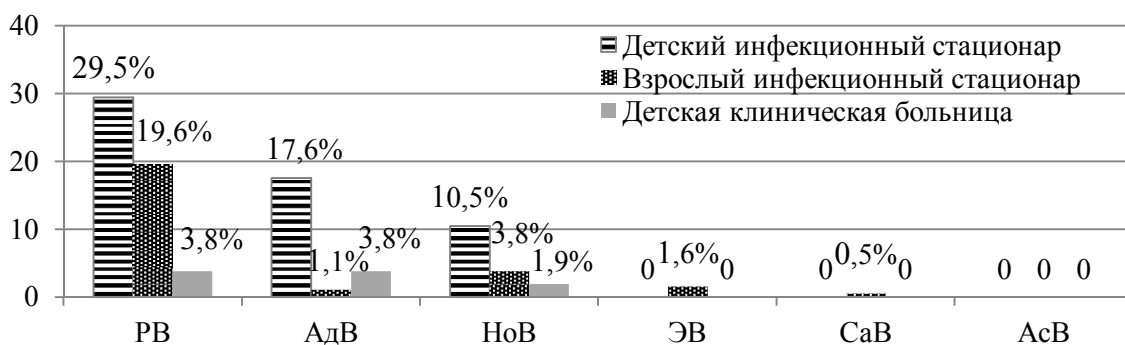


Рисунок 2. – Частота контаминации ОГС кишечными вирусами в учреждениях здравоохранения разного профиля, %

Таблица. – Частота выявления РНК/ДНК кишечных вирусов на поверхностях ОГС в условиях госпитальной среды обследуемых стационаров разного профиля

<i>Наименование ОГС</i>	<i>Количество исследованных ОГС</i>	<i>Количество контаминированных ОГС</i>	<i>Частота контаминации, %</i>
Унитазы и детские горшки	43	23	53,5
Ручки дверей	59	29	49,2
Ножки кровати пациента	23	10	43,5
Выключатели	23	9	39,1
Постельное белье и бачки для сброса постельного белья	46	17	37,0
Штативы капельницы	3	1	33,3
Столы обеденные	18	6	33,3
Краны водопроводные	23	7	30,4
Стулья	14	4	28,6
Батареи	7	2	28,6
Прикроватные тумбочки	22	5	22,7
Игрушки, гаджеты	17	4	23,5
Пол	18	4	22,2
Подоконники	19	4	21,1
Плинтусы	30	6	20,0
Руки пациентов	33	4	12,1
Раковины	21	2	9,5
Стены	27	2	7,4

В палатах пациентов детского стационара частота выявления генетических маркеров кишечных вирусов составила 36,9% и была максимальной при исследовании смывов с ножек кроватей (66,7%), поверхностей и ножек столов обеденных (55,6%). К эпидемически значимыми ОГС были отнесены также поверхности подоконников, пола у кровати пациентов, стульев, ручек дверей палаты, игрушек и гаджетов, частота контаминации которых находилась в пределах от 44,4% до 40,0%. Вирусное загрязнение постельного белья, рук пациентов, прикроватных тумбочек, батарей, плинтусов отмечалось в 28,6-23,1%. При анализе смывов с ОГС санитарных зон РНК/ДНК возбудителей КВИ обнаруживались в 53,4% проб и чаще всего – на крышках бачков для сброса белья (70,0%),

ручках и поверхностях дверей (68,8%), поверхностях унитазов и детских горшков (68,4%), выключателях (55,6%), кранах водопроводных (44,4%).

В палатах пациентов взрослого стационара, в отличие от детского, спектр контаминированных ОГС был менее разнообразным, а частота их выявления была практически в 2 раза ниже (19,2%). Наиболее эпидемически значимыми из данного перечня ОГС были постельное белье (38,5%), ножки кроватей и ручки дверей (по 36,4%), штативы капельниц (33,3%), прикроватные тумбочки (27,3%). В санитарной зоне, где частота выявления контаминированных поверхностей составила 27,1%, в число ОГС с максимальными уровнями загрязнения вошли ручки дверей в боксы и туалеты (45,5%), поверхности унитазов (44,4%), выключателей (27,3%), кранов водопроводных (18,2%).

В педиатрических отделениях детской клинической больницы регистрировались единичные случаи контаминации поверхности крана водопроводного, выключателя, шкафа для одежды, ночных горшков пациентов.

Результаты параллельно проведенной генодиагностики регистрируемых КВИ в данных лечебных учреждениях были положительными в 71,0% (n=31, позитивных 22) и 41,9% (n=31, позитивных 13) в детском и взрослом инфекционных стационарах, соответственно. В педиатрических отделениях детской клинической больницы случаев регистрации кишечных вирусных инфекций установлено не было. Этиология заболеваемости в детском инфекционном стационаре была обусловлена НоВ (35,6%), РВ (29,0%), АдВ (22,6%) и СаВ (6,5%), во взрослом – РВ (22,6%), НоВ (16,1%), ЭВ (3,2%) (рисунок 3).

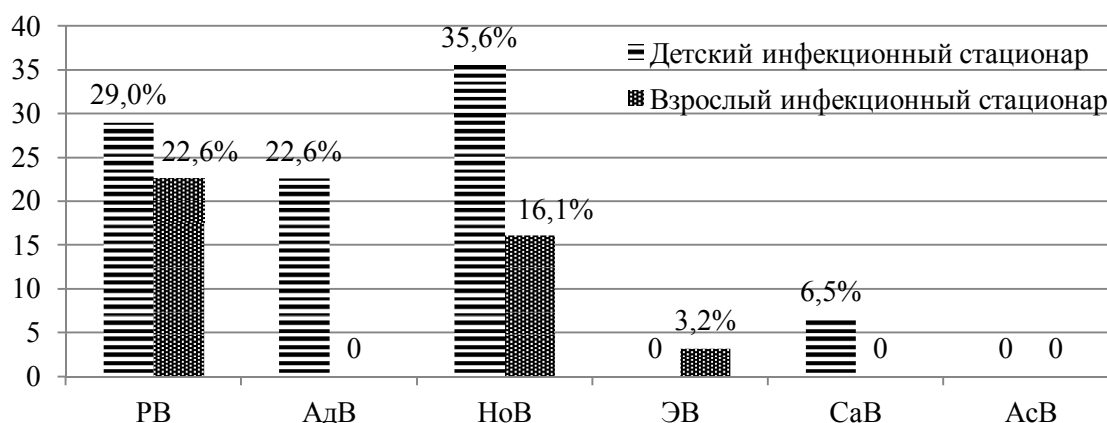


Рисунок 3. – Частота выявления возбудителей КВИ у пациентов детского и взрослого инфекционных стационаров, %

Все эпизоды диагностированных КВИ у взрослых пациентов были представлены моноинфекцией, у детей в 68,2% случаев регистрировалась кишечная инфекция, вызванная одним возбудителем, у 31,8% пациентов имела место смешанная инфекция, вызванная 2 возбудителями (РВ+НоВ, РВ+АдВ, РВ+СаВ и НоВ+АдВ).

Базируясь на полученных результатах для 5 эпизодов были выполнены молекулярно-генетические исследования выявленных вирусов-контаминантов ОГС («внешне-средовые» вирусы) и этиологических агентов заболеваемости кишечной вирусной инфекцией («клинические» вирусы) с последующим осуществлением их биоинформационного анализа.

В двух случаях были осуществлены секвенирование и филогенетический анализ в отношении РВ по гену VP7. В детском инфекционном стационаре «внешнесредовые» РВ (выявленные в смывах с плитуса в предбоксы и с крышки бачка для сброса использованного белья) и «клинический» РВ от пациента с ротавирусной инфекцией не имели

значительной степени генетического сходства. Оба вируса из ОГС принадлежали к генотипу G4, а вирус, идентифицированный у пациента, – к генотипу G9. При этом оба вируса из ОГС были очень сходны между собой (99,9%), тогда как каждый из них обнаруживал только 73,4% сходства с вирусом, выделенным из фекалий пациента.

В условиях взрослого инфекционного стационара «клинический» и «внешнесредовые» РВ принадлежали к одному и тому же генотипу – G9. РВ, обнаруженные на поверхностях ручки двери в санитарной комнате, крышке бачка и поверхности унитаза, имели высокую степень генетического сходства с вирусом, идентифицированным у пациента ($\geq 99,7\%$), что свидетельствовало о наличии молекулярно-эпидемиологической связи контаминации ОГС и случаем развития инфекции у пациента.

Еще для 2 эпизодов молекулярно-эпидемиологические исследования были осуществлены в отношении НоВ по генам полимеразы RdRh и основного капсидного белка VP1. В детском стационаре в отношении двух позитивных на НоВ образцов фекалий пациентов и положительного на выявление РНК НоВ смыва с ножек кровати пациента было установлено, что все «клинические» изоляты НоВ принадлежали к рекомбинантному генотипу GII.P16/GII.4, в то время как НоВ, присутствующий в смыве с ножек кровати пациента, относился к генотипу GII.2. Во взрослом стационаре результаты секвенирования и филогенетического анализа «клинического» и «внешнесредового» НоВ (поверхность кровати соседа по палате позитивного пациента), показали, что «клинический» изолят НоВ принадлежал к рекомбинантному генотипу GII.P16/ GII.4_Sydney, в то время как НоВ, присутствующий в смыве с ОГС, относился к генотипу GII.Pe.

С помощью секвенирования были получены фрагменты нуклеотидной последовательности гена penton base protein III АдВ, выявленных в четырех смывах с ОГС (ручка входной двери в предбокснике, бачок для сброса постельного белья, ведро для мусора, поверхность горшка пациента) детского стационара и в фекалиях пациента из той же палаты. Все «внешнесредовые» и «клинический» АдВ принадлежали к генотипу F41. АдВ, присутствующие в смывах с ОГС, имели высокую ($\geq 99,5\%$) степень генетического сходства с вирусом, обнаруженным у пациента. Следует отметить, что среди четырех «внешнесредовых» АдВ три из них (обнаруженные в смывах с ручки и поверхности входной двери в предбокснике, с бачка для сброса постельного белья, с ведра для мусора) имели 100% сходство между собой и 99,5 % сходство с АдВ, обнаруженным на поверхности детского горшка и в фекалиях пациента. В свою очередь последние были 100% идентичны между собой. В данном случае результаты молекулярного типирования и биоинформационного анализа «клинического» и «внешнесредовых» АдВ также свидетельствовали о наличии молекулярно-эпидемиологической связи между контаминацией ОГС и возникновением инфекции у пациента.

Выводы. Практическое использование разработанного алгоритма молекулярно-эпидемиологического расследования кишечных вирусных ИСМП в условиях госпитальной среды позволило выявить достаточно высокую контаминацию ОГС генетическим материалом известных возбудителей КВИ (31,2%), среди которых идентифицированы РВ, НоВ, АдВ, ЭВ, СаВ. Этиологическая структура регистрируемой в обследуемых стационарах КВИ была связана с теми же возбудителями. В ходе проведенного молекулярно-эпидемиологического расследования в 2 эпизодах с подозрением на ИСМП установлена высокая степень генетического сходства (не менее 99,0%) вирусов, выявленных у пациентов и в госпитальной среде (АдВ – в условиях детского инфекционного стационара и РВ – в условиях взрослого инфекционного стационара), что указывает на ОГС – как реальные факторы передачи КВИ.

Литература

1. Worldwide Database for Nosocomial Outbreaks [Electronic resource] / Institute for Hygiene and Environmental Medicine, Carite University Medicine Berlin, Germany. – Mode of access : <https://www.outbreak-database.com/AggregateSearchResult.aspx>. – Data of access: 07.07.2017.

2. Contamination by norovirus and adenovirus on environmental surfaces and in hands of conscripts in two Finnish garrisons / S. Oristo [et al.] // *Food Environ. Virol.* – 2017. – Vol. 9. – P. 62-71.
3. 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.
4. Алгоритм молекулярно-эпидемиологического расследования заболеваемости кишечными вирусными инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / Т.В. Амвросьева [и др.] // *Достижения медицинской науки Беларуси: науч. рец. полнотекст. база данных [Электронный ресурс].* – Минск: ГУ РНМБ, 2017. – Вып. 22. – Режим доступа : http://med.by/dmn/book.php?book=17-16_1. – Дата доступа: 12.12.2017.
5. 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.
6. 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.
7. Bennett, S. The development of a multiplex real-time RT-PCR for the detection of adenovirus, astrovirus, rotavirus and sapovirus from stool samples / S. Bennett, R.N. Gunson // *J. Virol. Methods.* – 2017. – Vol. 242. – P. 30-34.
8. Development of enhanced primer sets for detection of norovirus [Electronic resource] / B.-H. Kong // *BioMed. Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 103052, 9 pp. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/103052>. – Date of access : 27.11.2017.
9. Manual of rotavirus detection and characterization methods [Electronic resource] / World Health Organization, Dept. of Immunization, Vaccines and Biologicals. – Geneva: WHO, 2009. – Mode of access: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70122/1/WHO_IVB_08.17_eng.pdf. – Date of access: 06.11.2017.
10. A molecular epidemiologic study of human adenovirus type 8 isolates causing epidemic keratoconjunctivitis in Kawasaki City, Japan in 2011 / T. Fujimoto [et al.] // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 65. – P. 260-263.
11. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – Vol. 30, No. 12. – P. 2725-2729.

ALGORITHM OF MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF HEALTH CARE-ASSOCIATED INFECTIONS: RESULTS OF PRACTICAL USE

**Amvrosieva T.V., Bohush Z.F., Shilova Yu.A., Laziuk C.K., Kazinets O. N.,
Paklonskaya N.V., *Kishkurno E.P.**

*Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

The article is devoted to the urgent problem of health care-associated infections. The article describes the results of molecular-epidemiological studies aimed at detection of virus (rota-, noro-, adeno-, astro-, sapo- and enterovirus) contamination of hospital surfaces and its identification as a possible source of the secondary infection of patients. The results indicate the high levels of surface contamination in the children's and adult infectious hospitals (43,8% and 22,8%, respectively) and the presence of a prominent associative relationship between spectra of enteric virus in patients of infectious hospitals and viral contamination of hospital surfaces. In 2 episodes, a high degree of genetic similarity (at least 99.0%) of viruses detected in patients and in the hospital environment was established (adenoviruses in the children's infectious hospital and rotaviruses in the adult infectious hospital). This indicated an hospital surfaces as possible transmission factors of enteric viral infections.

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

Поступила 09.09.2019

ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ

¹Дронина А.М., ²Гузовская Т.С., ¹Самойлович Е.О.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Обсуждаются вопросы распространенности ветряной оспы на различных территориях Республики Беларусь. В общей структуре заболеваний ветряной оспой наибольший удельный вес (24,9%) приходился на жителей г. Минска и Брестской области (15,7%). Диапазон колебаний среднесреднегодных годовых показателей заболеваемости составлял от 559,3,2 ‰ (Витебская область) до 835,3 ‰ (г. Минск). Во всех регионах Республики Беларусь отмечалась тенденция к росту заболеваемости и малая цикличность длительностью 2-3 года. В течение 2008-2015 гг. периодичность во всех регионах носила синхронный характер, а в 2016 г. отмечена асинхронность течения эпидемического процесса в Могилевской и Минской областях.

Ключевые слова: ветряная оспа, заболеваемость, многолетняя динамика, цикличность, тенденция эпидемического процесса

Введение. Ветряная оспа является актуальной проблемой инфекционной патологии. Для осуществления эпидемиологического надзора за ветряной оспой в современных условиях и разработки стратегии управления эпидемическим процессом таких как вакцинация, представляют интерес определение уровня серопревалентности в общей популяции, которая отражает истинные масштабы распространения инфекции. Генотипирование вируса ветряной оспы/опоясывающего лишая позволит не только установить взаимосвязь между генотипами и вызванными ими осложнениями, что имеет прогностическое значение для ведения пациента в клинике, но и позволит объяснить этиологию и патогенез других, не менее важных и серьезных заболеваний человека, связанных с инфицированием данным вирусом, и как следствие, приведет к разработке эффективной профилактики и лечения этих нозоформ [1, 2]. При организации серологических исследований большое значение имеют эпидемиологические данные, включая особенности географического распространения, отражающие закономерности развития эпидемического процесса [3].

Цель исследования – установить особенности территориального распределения заболеваемости ветряной оспы в регионах за длительный отрезок времени.

Материалы и методы. В работе использованы данные о случаях заболевания с окончательным диагнозом «ветряная оспа» (B01 по МКБ-10), зарегистрированных на различных территориях Республики Беларусь в 2008-2018 гг. (уч. ф.01 – годовая, ф. 060-у, ф. 357-у). Уровни заболеваемости оценивали по показателям, рассчитанным на 100 000 населения (‰) [ДИ 95%].

С использованием дескриптивного метода проведено сплошное, ретроспективное, продольное эпидемиологическое исследование. Многолетнюю тенденцию заболеваемости в регионах определяли методом наименьших квадратов по параболе 1 порядка и оценивали по направлению и среднему темпу прироста (Тпр). При оценке цикличности эпидемического процесса оценивали определяли количество, продолжительность, амплитуды периодов [0].

Достоверность различий между показателями или средними величинами определяли по критерию t Стьюдента и χ^2 , между долями – по критерию z, нормальность распределения – по коэффициенту асимметрии, характер и силу связи между

динамическими рядами при нормальном распределении – по коэффициенту корреляции Пирсона. Доверительные интервалы (ДИ) определяли методом Клоппера-Пирсона [5].

Обработка полученных данных проводилась с использованием компьютерных программ: Excel, Statistica 9.0.

Результаты и их обсуждение. В общей структуре заболеваний ветряной оспой, зарегистрированных в Республике Беларусь, за период 2008-2018 гг. наибольший удельный вес (24,9% [95% ДИ: 24,14; 25,7]) приходился на жителей столичного города и Брестской области (15,7%, [95% ДИ: 15,2; 16,2]). Наименьший вклад в общую структуру заболеваний ветряной оспой вносили жители Гродненской (10,4%, [95% ДИ: 9,9; 10,9]), Могилевской (10,9%, [95% ДИ: 10,4; 11,4]) и Витебской (10,7%, [95% ДИ: 10,3; 11,1]) областей (рисунок 1).

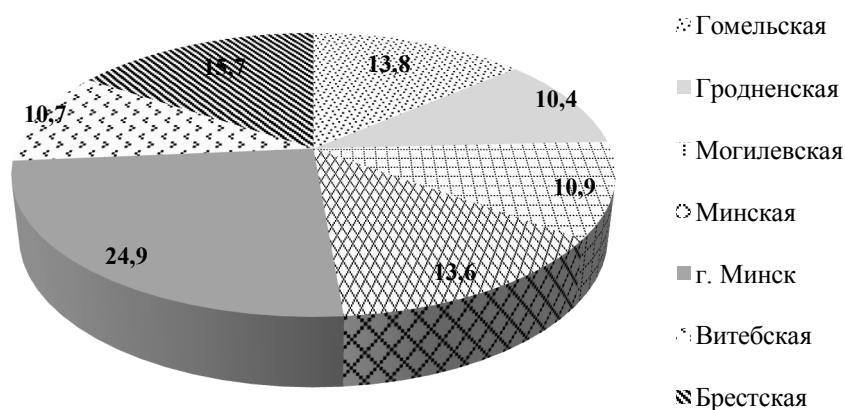


Рисунок 1. – Структура заболеваний ветряной оспой на различных территориях Республики Беларусь (среднегодовые данные)

Изучение территориального распространения ветряной оспы показало, что в течение 2008-2018 гг. заболеваемость этой инфекцией встречалась на всех территориях Республики Беларусь. Диапазон колебаний среднегодовых показателей заболеваемости составлял от 559,3,2 ‰ [95% ДИ: 545,84; 572,8] (Витебская область) до 835,3 ‰ [95% ДИ: 822,1; 848,5] (г. Минск). Высокий среднегодовой показатель заболеваемости ветряной оспой отмечался в Брестской области (736,3 ‰ [95% ДИ: 721,7; 750,9]). Риск заболеть данной инфекцией населения, проживающего в г. Минске и Брестской области, выше по сравнению с жителями Витебской области (ОР=1,5 и ОР=1,3 соответственно). Среднегодовые уровни заболеваемости на территории областей Минской (609,8 ‰ [95% ДИ: 596,8; 622,8]) и Гомельской (614,5 ‰ [95% ДИ: 601,4; 627,6]), а также Гродненской (629,2 ‰ [95% ДИ: 613,9; 644,5]) и Могилевской (643,2 ‰ [95% ДИ: 627,8; 658,6]) были относительно равнозначны ($p > 0,5$) (рисунок 2).

Высокий уровень заболеваемости ветряной оспой в г. Минске закономерен и обусловлен большей возможностью реализации инфекционного потенциала возбудителя в связи с высокой численностью и плотностью населения. Установлена прямая сильная корреляционная связь между заболеваемостью и численностью населения различных областей республики ($r=0,73$, $p < 0,5$).

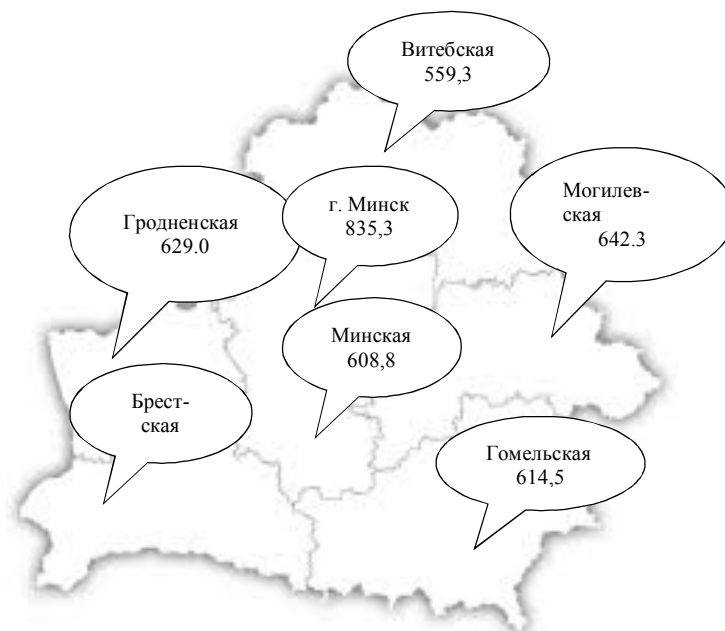


Рисунок 2. – Заболеваемость ветряной оспой населения различных территорий Республики Беларусь за период 2008-2018 гг. (среднегодовые уровни)

Сравнивая уровни заболеваемости ветряной оспой в различных регионах Республики Беларусь, можно отметить, они остаются высокими с небольшими колебаниями по годам и определяются наличием приобретенного иммунитета у населения.

Несмотря на то, что во всех регионах Республики Беларусь отмечалась тенденция к росту заболеваемости, в областях с более низкими ее показателями темпы прироста были выше (Могилевская – Тпр.=+5,1%; $p<0,05$, Гродненская – Тпр.=+4,7%; $p<0,05$), чем в областях с более высокими показателями (Брестская область – Тпр.=+3,6%; $p<0,05$, г. Минск – Тпр.=+2,8%; $p<0,05$). Заболеваемость на территории 3 областей имела умеренную тенденцию к росту (Витебская – Тпр.=+2,5%; $p<0,05$, Минская – Тпр.=+2,3%; $p<0,05$, Гомельская – Тпр.=+2,1%; $p<0,05$) (таблица).

Таблица. – Среднегодовые уровни и многолетняя тенденция заболеваемости ветряной оспой населения различных территорий Республики Беларусь за период 2008-2018 гг.

Область	Ранговое место по уровню заболеваемости	Среднегодовой показатель заболеваемости (2008-2018 гг.) ‰	Общее число случаев	Темп прироста (%)
г. Минск	1	835,3 [95% ДИ: 822,1; 848,5]	175634	+2,8%; $p<0,05$
Брестская	2	736,3 [95% ДИ: 721,7; 750,9]	110751	+3,6%; $p<0,05$
Могилевская	3	643,2 [95% ДИ: 627,8; 658,6]	76646	+5,1%; $p<0,05$
Гродненская	4	629,2 [95% ДИ: 613,9; 644,5]	73499	+4,7%; $p<0,05$
Гомельская	5	614,5 [95% ДИ: 601,4; 627,6]	96860	+2,1%; $p<0,05$
Минская	6	609,8 [95% ДИ: 596,8; 622,8]	95827	+2,3%; $p<0,05$
Витебская	7	559,3 [95% ДИ: 545,84; 572,8]	75163	+2,5%; $p<0,05$

Для ветряной оспы на всех территориях республики свойственна цикличность с чередованием периодов подъема и спада заболеваемости каждые 2-3 года. В течение 2008-2015 гг. периодичность во всех регионах носила синхронный характер, а в 2016 г. отмечена асинхронность течения эпидемического процесса в Могилевской и Минской областях. Наибольшая амплитуда колебаний (722,8‰) характерна для г. Минска, наименьшая – Гомельской области (105,0‰). Генез цикличности рассматривается с позиций инфекционно-иммунологических взаимоотношений между популяциями людей и возбудителей.

Заключение. Таким образом, характеристиками многолетней динамики заболеваемости ветряной оспой являются: неравномерность распределения показателей заболеваемости по годам, прямолинейная тенденция к росту во всех регионах, малая цикличность, синхронность в 2008-2015 гг. во всех регионах и асинхронность в 2016 г. в Могилевской и Гомельской областях. Данные о территориальных особенностях распределения заболеваемости ветряной оспой необходимо использовать при проведении серо-эпидемиологического исследования.

Литература

1. Структура осложнений VZV инфекции у взрослых и детей и ее взаимосвязь с генотипами вируса ветряной оспы/опоясывающего лишая / Н. Н. Попов [и др.] // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. – 2012. – № 1024. – С. 91-98.
2. Varicella zoster virus in progressive forms of multiple sclerosis / G. Ordonez [at al.] // Clin. Neurol. Neurosurg. – 2010. – Vol. 112, No. 8. – P. 653-657.
3. WHO Vaccine-Preventable Diseases Surveillance Standards. Varicella, September 5, 2018 [Electronic resource] – Mode of access: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/WHO_SurveillanceVaccinePreventable_22_Varicella_BW_R2.pdf?ua=1. – Date of access: 10.09.2019.
4. Эпидемиологическая диагностика: учеб. пособие / Г.Н. Чистенко [и др.]; под ред. Г.Н. Чистенко. – Минск: БГМУ, 2007. – 148 с.
5. Зайцев, В.М. Прикладная медицинская статистика: учеб. пособие / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский. – М., 2006. – 432 с.

TERRITORY FEATURES OF THE EPIDEMIC PROCESS OF THE VARICELLA

¹Dronina A.M., ²Guzovskaya T.S., ¹Samoilovich E.O.

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

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The prevalence of varicella in various territories of the Republic of Belarus is discussed. In the general structure of varicella morbidity, the largest share (24.9%) was accounted for by residents of Minsk city and the Brest region (15.7%). The range of fluctuations in the annual average incidence rates ranged from 559.3.2‰ (Vitebsk region) to 835.3‰ (Minsk). In all regions of the Republic of Belarus, there was a tendency to an increase in the incidence rate and low cyclic duration of 2-3 years. During 2008-2015 the frequency in all regions was synchronous, and in 2016 the asynchrony of the epidemic process in the Mogilev and Minsk regions was noted.

Keywords: varicella, morbidity, long-term dynamics, cyclic recurrence, epidemic process.

Поступили 19.09.2019

НАДЗОР ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА У ДЕТЕЙ ДО 15 ЛЕТ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2017 И 2018 гг.

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

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Выявление и клинико-лабораторное обследование заболеваний с синдромом острого вялого паралича (ОВП) у детей в возрасте до 15 лет (полиомиелитоподобных заболеваний) составляет основу эпидемиологического надзора за полиомиелитом. В Республике Беларусь в 2017 г. выявлено 64 случая ОВП, в 2018 г. – 35 случаев. Показатель заболеваемости за эти годы составил 4,0 и 2,2 на 100 000 детей этого возраста, соответственно, что существенно превышало рекомендованный уровень (не менее 1 на 100 000 детей). Все заболевшие были обследованы вирусологически в национальном референс-центре по полиомиелиту, ни одного полиовируса от заболевших выделено не было. На основании клинико-лабораторных данных все случаи ОВП в 2017-2018 гг. были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной этиологии.

Ключевые слова: полиомиелит, острый вялый паралич, полиовирус.

Введение. В выполнении Программы глобальной эрадикации полиомиелита (далее – Программа), наряду с высоким охватом вакцинацией, основная роль принадлежит эпидемиологическому надзору за полиовирусной инфекцией, призванному отслеживать и убедительно подтверждать прогресс или выявлять текущие проблемы в выполнении Программы.

С начала выполнения Программы в 1988 г. произошел целый ряд значимых изменений: число стран с эндемичной циркуляцией диких полиовирусов (ПВ) уменьшилось до трех (Пакистан, Афганистан, Нигерия); ежегодное число случаев паралича, вызванных диким ПВ, сократилось с 350 000 до нескольких десятков (33 в 2018 г.); в последние годы все эти случаи вызваны только ПВ серотипа 1; ПВ серотипа 2 не встречаются нигде в мире с 1999 г., что позволило в 2015 г. сертифицировать его глобальное искоренение; с 2012 г. также более не обнаруживается ПВ серотипа 3 [1]. В то же время, как в эндемичных, так и с свободных от дикого ПВ странах регистрируются вспышки полиомиелита, вызванные нейровирулентными дериватами живых вакцинных ПВ, так называемыми вакцинородственными ПВ, все трех серотипов. В 2018 г. 104 таких случая были зарегистрированы в 6 странах мира.

В Беларуси для иммунизации против полиомиелита используется только инактивированная трехвалентная вакцина (содержит инактивированные штаммы ПВ серотипов 1, 2 и 3). Однако во многих других странах мира используется как инактивированная, так и живая вакцина, содержащая вакцинные ПВ1 и ПВ3 (живой вакцинный ПВ2 в мире более не используется) [2]. Учитывая активную миграцию населения, ПВ различного происхождения могут быть завезены и в нашу страну.

Эпидемиологический надзор за полиомиелитом включает выявление и расследование полиомиелитоподобных заболеваний – синдрома острого вялого паралича (ОВП) у детей в возрасте до 15 лет, слежение за циркуляцией ПВ в популяции человека и их обнаружение в объектах окружающей среды. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, в течение всего периода выполнения Программы именно слежение за случаями ОВП было и остается основным элементом надзора [3].

Рекомендованный ВОЗ показатель выявления случаев ОВП составляет не менее 1 на 100 000 детей до 15 лет, при обострении эпидемиологической ситуации он может быть увеличен до 2-3 случаев. Вирусологическое обследование заболевших для установления этиологии паралича должно проводиться в аккредитованной ВОЗ лаборатории и включает исследование двух образцов стула от каждого пациента [3]. В Беларуси надзор за случаями ОВП проводится с 1996 г. и охватывает всю территорию страны. Целью настоящего исследования явился анализ результатов надзора за ОВП в Беларуси в 2017-2018 гг.

Материалы и методы. Выявление случаев ОВП на территории Беларуси проводилось в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения полиомиелита» (утв. 28.12.2015 № 137).

Образцы стула заболевших для проведения вирусологического исследования доставлялись в национальный референс-центр по полиомиелиту (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Адекватным считали исследование двух образцов стула, собранных в первые 14 дней паралича с интервалом 24-48 часов между образцами. Выделение кишечных вирусов проводили в культурах клеток Hep2C, RD, L20B [4]. Серотипирование ПВ выполняли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ типов 1, 2 и 3. Выделение вирусной ДНК/РНК из культуральной жидкости проводили с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Молекулярную идентификацию ПВ и ЭВ проводили методом одностадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени [5]. Идентификацию аденовирусов проводили методом ПЦР с использованием описанных в литературе праймеров [6]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, pH 8,5 (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА) с добавлением красителя бромистый этидий.

Результаты и обсуждение. В 2017 г. в Беларуси было выявлено 64 случая ОВП, в 2018 г. – 35 случаев (таблица 1).

Таблица 1. – Заболеваемость ОВП и показатели сбора двух образцов стула от заболевших в регионах Республики Беларусь, 2017-2018 гг.

Регионы	Случаи ОВП				С двумя адекватными образцами стула*			
	2017		2018		2017		2018	
	абс.	‰	абс.	‰	абс.	%	абс.	%
Брестская	12	4,8	4	1,6	12	100,0	4	100,0
Витебская	6	3,4	4	2,3	6	100,0	4	100,0
Гомельская	8	3,3	4	1,6	8	100,0	4	100,0
Гродненская	5	2,7	4	2,2	3	60,0	4	100,0
г. Минск	18	5,5	8	2,4	18	100,0	8	100,0
Минская	10	4,2	8	3,3	8	80,0	8	100,0
Могилевская	5	2,9	3	1,8	5	100,0	3	100,0
Итого по РБ	64	4,0	35	2,2	60	93,8	35	100,0

Примечание: * – оба образца собраны не позднее 14 дня от начала паралича.

Показатель регистрации ОВП на национальном уровне составил в 2017 г. 4,0 на 100 000 детей до 15 лет (от 2,7 до 5,5 в регионах страны), в 2018 г. – 2,3 на 100 000 детей (от 1,6 до 3,3 в регионах страны).

Основную долю заболевших составили дети 6-14 лет: 70,3% (45 детей) в 2017 г. и 74,3% (26 детей) в 2018 г. Доля детей 0-5 лет, которые считаются основной группой риска развития полиомиелита, составила 29,7% (19 детей) в 2017 г. и 25,7% (9 детей) в 2018 г., что ежегодно было достоверно меньше доли детей старше 5 лет ($p=0,01$).

Не менее трех доз вакцины (минимально необходимый курс вакцинации против полиомиелита в соответствии с критериями ВОЗ) получили 96,9% (62/64) детей в 2017 г. и 97,1% (34/35) в 2018 г. Из трех непривитых детей с ОВП два (в возрасте 12 месяцев и 4 лет) не были привиты в связи с отказом родителей. Третий ребенок (возрасте 7 месяцев) получил лишь одну дозу вакцины в связи с индивидуальной схемой вакцинации по состоянию здоровья. Выявление ОВП у ребенка, получившего менее трех доз вакцины (или не имеющего информации о вакцинации), рассматривается как «горячий случай», который требует максимально быстрого вирусологического обследования и предоставления результатов в Европейское региональное бюро ВОЗ.

В 2017 и 2018 гг. по два образца стула были получены от всех заболевших, однако только в 2018 г. во всех случаях они были собраны не позднее 14 дней от начала паралича. В 2017 г. в 4 (6,3%) из 64 случаев обследование было проведено более чем через 14 дней в связи с поздним обращением родителей за медицинской помощью.

Как в 2017 г., так и в 2018 г. ни у одного из заболевших в образцах стула ПВ обнаружены не были. В 2018 г. никаких других кишечных вирусов от заболевших так же выделено не было. В 2017 г. неполиомиелитные вирусы были обнаружены у четырех детей: в двух случаях они являлись неполио-энтеровирусами и в двух – аденовирусами (таблица 2). Один из случаев с выделением аденовируса являлся «горячим случаем» ОПВ.

Таблица 2. – Выделение кишечных вирусов от пациентов с ОВП, 2017-2018 гг.

<i>Эпидномер, возраст</i>	<i>Заключительный диагноз, дата заболевания/ даты обследования</i>	<i>Вакцинация против полиомиелита</i>	<i>№ образца</i>	<i>Выделен вирус</i>
603-17-02 12 лет	Нейропатия левого малоберцового нерва 15.12.2016 / 06-08.01.2017	V6 (ОПВ) 13.05.2011	37875 37876	Аденовирус Аденовирус
322-17-27 7 мес.	Моноплегия левой верхней конечности 10.05.17 / 12-13.05.2017	V1 (ИПВ) 18.04.2017	37956 37957	Аденовирус Аденовирус
606-17-47 14 лет	Посттравматическая нейропатия правого малоберцового нерва 22.09.2017 / 03-04.10.2017	V6 (ОПВ) 26.10.2010	38031 38032	Экхо 6 Экхо 6
105-17-48 2 года	Инфекционно-аллергическая полирадикулонейропатия 07.10.2017 / 07-10.10.2017	V3 (ИПВ) 22.01.2016	38038 38039	Коксаки В5 Коксаки В5

У ребенка в возрасте 14 лет, выделявшего энтеровирус Экхо 6, ОВП являлся результатом посттравматической нейропатии малоберцового нерва. Пробы стула были забраны через 5 дней после поступления в стационар, на фоне ОРИ, риносинусита (что могло быть проявлением энтеровирусной инфекции). Ребенок имел полный курс вак-

цинации против полиомиелита в соответствии с возрастом. Через 60 дней после начала заболевания отмечалась выраженная положительная динамика в неврологическом статусе, незначительные остаточные явления не соответствовали таковым при полиомиелите.

У ребенка в возрасте 2 года, выделявшего энтеровирус Коксаки В5, инфекционно-аллергическая полирадикулонейропатия развилась на фоне фебрильной лихорадки, явлений ОРИ. Против полиомиелита ребенок был привит в соответствии с возрастом. В результате проведенного лечения все явления ОВП исчезли, через 60 дней от начала заболевания никаких остаточных парезов не наблюдалось.

Аденовирусы были изолированы от двух детей: в возрасте 12 лет, получившего полный курс вакцинации против полиомиелита, и в возрасте 7 месяцев, получившего лишь одну прививку в соответствии с индивидуальной схемой вакцинации («горячий случай»). В результате проведенного лечения в обоих случаях у детей произошло полное восстановление функции конечности без каких-либо остаточных явлений ОВП.

На основании клинико-лабораторных данных все случаи ОВП в 2017 и 2018 гг. были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной этиологии. Преобладающими нозологическими формами являлись инфекционно-аллергическая полинейропатия и моновропатия нижней конечности: 26,6% и 34,4%, соответственно, в 2017 г., 34,3% и 25,7%, соответственно, в 2018 г. Среди других диагнозов встречались травматический неврит малоберцового нерва, моновропатия верхней конечности, преходящий монопарез нижней конечности, поражение нервных сплетений, объемные новообразования.

Заключение. В 2017 и 2018 гг. в Республике Беларусь показатель регистрации случаев ОВП превышал рекомендованной ВОЗ уровень (не менее 1 на 100 000 детей до 15 лет) и составил на национальном уровне 4,0 и 2,2 на 100 000 детей до 15 лет, соответственно. Важным показателем высокого качества выявления заболеваний, подозрительных на полиомиелит, явилось то, что ни на одной из территорий 1 административного уровня этот показатель не был менее 1 и достиг в каждой из областей и г. Минске уровня 2,7-4,8 в 2017 г. и 1,6-3,3 в 2018 г.

Вероятность выделения ПВ в случае полиомиелита является наиболее высокой в первые 2 недели от начала паралича, поэтому обеспечение сбор образцов стула практически во всех случаях в эти сроки свидетельствует об адекватном проведении обследования в последние два года. Для всех выявленных в стране случаев ОВП все этапы вирусологического исследования проводятся только в аккредитованной ВОЗ лаборатории – национальном референс-центре по полиомиелиту, что позволяет обеспечить применение одинаковых методик и соблюдение общепринятых мировых стандартов в работе. Лабораторное заключение об отсутствии ПВ в образцах стула пациентов явилось надежным дополнением клинико-эпидемиологических данных и позволило сделать заключение об отсутствии полиомиелита в стране. Все 99 случаев ОВП в 2017-2018 гг. были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной этиологии.

Сохранение резервуара диких ПВ в эндемичных странах и формирование нейровирулентных вакцинородственных штаммов ПВ в мире свидетельствует о постоянном риске завоза таких вирусов на благополучные территории. Для поддержания статуса Беларуси как страны, свободной от полиомиелита, необходимо сохранение высокого уровня охвата вакцинацией и проведение качественного эпидемиологического надзора для оперативного выявления возможных завозов и принятия ответных мер.

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения. Полиомиелит. – 3 января 2019 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/factsheets/detail/poliomyelitis>. – Дата доступа: 16.09.2019.
2. Polio vaccines: WHO position paper – March, 2016 / Wkly Epidemiol. Rec. – 2016. – Vol. 91, No. 12. – P. 145-168.
3. Global Polio Eradication Initiative. Surveillance Indicators [Electronic resource]. – Mode of access: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/surveillance-indicators/>. – Date of access: 16.09.2019.
4. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. – Женева: ВОЗ, 2005. – 112 с.
5. Алгоритм ускоренной детекции и идентификации полиовирусов с использованием молекулярных методов: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 23.04.2019, рег. номер 001-0419.
6. Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region / I. Casas [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 6176-6182.

SURVEILLANCE OF ACUTE FLACCID PARALYSIS SYNDROME IN CHILDREN UNDER 15 YEARS OF AGE IN THE REPUBLIC OF BELARUS IN 2017 AND 2018

Yermalovich M.A., Samoilovich E.O., Ukhava I.F., Svirchevskaya E.Yu., Semeiko G.V.

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

The identification of acute flaccid paralysis syndrome (AFP) in children under the age of 15 years (polio-like diseases) followed by clinical and laboratory examination of the cases is the basis of the epidemiological surveillance of poliomyelitis. In the Republic of Belarus in 2017 in total 64 cases of AFP were identified, in 2018 – 35 cases. The incidence rate for these years was 4.0 and 2.2 per 100,000 children under 15 years of age, respectively, and significantly exceeded the recommended level (1 per 100,000 children). All patients were examined virologically at the national polio reference center; not a single PV was isolated from the patients. Based on clinical and laboratory data all AFP cases in 2017-2018 were classified as paralytic diseases of non-polio etiology.

Keywords: poliomyelitis, acute flaccid paralysis, poliovirus.

Поступила 18.09.2019

АНАЛИЗ ДИСПАНСЕРНОГО УЧЕТА КОНТИНГЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ ПОД НАБЛЮДЕНИЕМ ФТИЗИАТРОВ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Климук Д.А., Гуревич Г.Л., Скрягина Е.М., Калечиц О.М., Белько А.Ф.,
Бобрукевич Е.Л., Тышко М.А., Данькова А.В., Ильясова Е.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Основным каналом формирования численности контингентов с туберкулезом органов дыхания являются лица с впервые установленным диагнозом туберкулеза с бактериовыделением, а также снятые с бациллярного учета в результате эффективного лечения. Заметное влияние на численность контингентов оказывает ежегодно регистрируемая рецидивная заболеваемость. За последние 7 лет отмечается тенденция к росту множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза у вновь выявленных пациентов, которая достигла 37,0% (32,7% в 2012 г.). Среди контингентов бактериовыделителей отмечается рост множественной лекарственной устойчивости с 65,7% в 2012 г. до 78,7% в 2018 г. Напряженность эпидемической ситуации поддерживают пациенты с туберкулезом из пенитенциарной системы – 2,8%, а также лица с синдромом алкогольной зависимости – 14,7% и ВИЧ-инфицированные – 6,5%.

Ключевые слова: туберкулез, эпидемиология, рецидивы, система диспансеризации, группы учета.

Введение. Туберкулез в современный период продолжает оставаться актуальной медицинской и социальной проблемой здравоохранения. Несмотря на существенные успехи в диагностике туберкулеза, широкое использование современных бактериологических и молекулярно-генетических методов, а также высокоэффективных противотуберкулезных лекарственных средств, в Беларуси каждый год почти 2 тысячи человек заболевает туберкулезом, 250 человек умирают от этой болезни, из них 72,4% в трудоспособном возрасте. Около 4 тысяч человек находятся под диспансерным наблюдением в противотуберкулезных организациях, из них почти 80% являются бактериовыделителями [1, 2]. Особую тревогу вызывает высокий удельный вес пациентов, у которых впервые диагностируется множественно лекарственно-устойчивые формы туберкулеза (37,0%), которые с трудом поддаются лечению, а нередко приводят к инвалидизации, а порой и к летальному исходу [3].

Диспансерный метод обслуживания пациентов, страдающих туберкулезом, продолжает оставаться основным в организации борьбы с туберкулезом [1, 4]. Клинически необоснованная задержка пациентов в группах диспансерного учета, несвоевременный перевод в неактивные группы, а также существующие ограничения в допуске к работе (учебе) лиц, состоящих на учете в активных группах диспансерного наблюдения, но не представляющих эпидемической опасности для общества, наносят психологический дискомфорт человеку и значительный экономический ущерб экономике страны. Возникает необходимость в разработке новой научно-обоснованной модели противотуберкулезной помощи, ориентированной на нужды людей, направленной на смещение услуг по профилактике, лечению и ведению пациентов, больных туберкулезом, в амбулаторные условия, что позволяет сократить расходы, расширить возможности и обеспечить высококачественную медицинскую помощь, ориентированную на пациента [5].

В современных условиях существующая диспансерная группировка контингентов противотуберкулезных организаций не отвечает требованиям изменившейся эпидеми-

ческой ситуации, новым достижениям в области фтизиатрической науки и практики и нуждается в научно-обоснованной доработке.

Цель работы: разработать и внедрить новую систему диспансеризации и учета пациентов противотуберкулезных организаций Республики Беларусь.

Материалы и методы. Объектом исследования были пациенты с рецидивом множественно лекарственно-устойчивого туберкулеза (МЛУ-ТБ) (основная группа) и пациенты с лекарственно-чувствительным туберкулезом (ЛЧ-ТБ) (контрольная группа), которым проводилось клинико-рентгенологическое и бактериологическое обследование. В каждом случае заполнялась индивидуальная карта на пациента в период первичного установления диагноза и повторного заболевания (рецидива) для включения в базу данных с перечнем вопросов по разделам демографической, социальной, поведенческой информации, статусу лечения; клинических проявлений заболевания; подробная информация по бактериологическому обследованию и лекарственной чувствительности.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась в операционной среде «Windows XP» с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0, США.

Результаты исследования и обсуждение. Одновременно с новыми подходами в диагностике и лечении совершенствовалась система диспансерного наблюдения пациентов противотуберкулезных организаций (ПТО), изменялись частота врачебных осмотров, кратность и виды инструментальных и лабораторных исследований, изложенных в соответствующих инструктивно-методических документах. Это обстоятельство касается и действующей с 2012 г. Инструкции по группировке пациентов противотуберкулезных организаций, подлежащих диспансерному учету и динамическому наблюдению, которая требует внесения в нее дополнений и изменений.

В последние годы уменьшилась численность диспансерных контингентов активных групп наблюдения, что привело к снижению нагрузки врачей на амбулаторном приеме в ПТО. В то же время, необоснованная задержка излеченных пациентов на учете ПТО влечет за собой огромные экономические потери для общества.

Численность контингентов с активным туберкулезом в Республике Беларусь за последние 10 лет, в том числе с бактериовыделением (МБТ+), МЛУ-ТБ, представлена на рисунке 1.

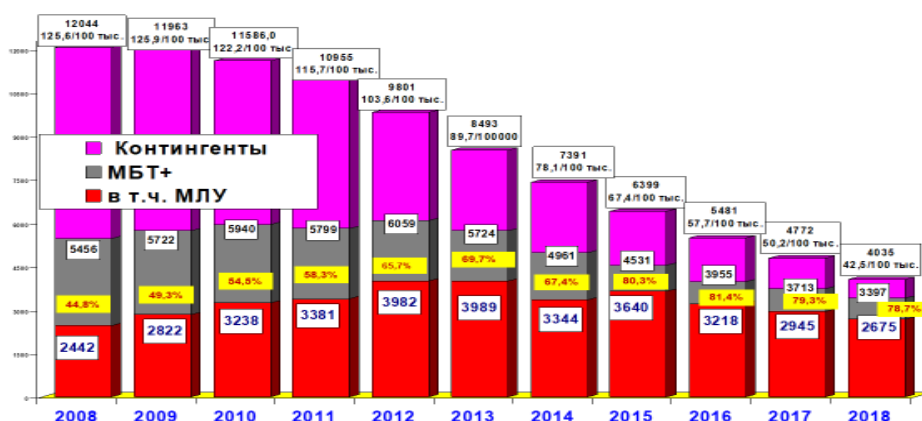


Рисунок 1. – Контингенты пациентов, страдающих туберкулезом (все формы, в т.ч. МЛУ), данные Министерства здравоохранения Республики Беларусь (2008-2018 гг.)

Интенсивный показатель численности контингентов с активным туберкулезом с 2012 г. (103,6 на 100 000) заметно снижается и в 2018 г. составил 42,5 на 100 000 (-59,0%). Контингенты с МБТ+ за этот период снизились на 43,9%, а с МЛУ-ТБ – на 32,8%. Однако доля состоящих на диспансерном учете пациентов с бактериовыделением за последние 4 года увеличилась: 2015 г. – 61,3; 2016 г. – 72,1; 2017 г. – 77,8 и 2018 г. – 84,2, за счет роста МЛУ-ТБ соответственно 80,3%; 81,4%, 79,3% и 78,7%. Контингенты, в основном, сокращены за счет ликвидации VII группы диспансерного наблюдения (ДН) для лиц с остаточными посттуберкулезными изменениями в легких, наблюдавшимися в тубдиспансерах в профилактических целях, которые переданы в лечебно-профилактические организации по месту жительства.

Отмечается уменьшение числа пациентов, впервые взятых на учет по активным группам диспансерного наблюдения с 2684 в 2016 г. до 1914 в 2018 г., изменилась в положительную сторону структура клинических форм заболевания, увеличилось число пациентов, излеченных от туберкулеза и снятых с диспансерного учета. В результате численность контингентов с активными формами туберкулеза, состоящих на учете противотуберкулезных организаций, уменьшилось в 2018 г. по сравнению с 2016 г. на 1446 человек и составила 4035 человек. В расчете на число врачей-фтизиатров (325 человек) приходится 12 пациентов с активным туберкулезом на 1 врача-фтизиатра.

С целью определения тактики диспансерного наблюдения пациентов с туберкулезом, нами изучена структура клинических форм туберкулеза органов дыхания (ТОД) у пациентов за 2018 г. в сопоставлении с 2012 г. (рисунок 2).

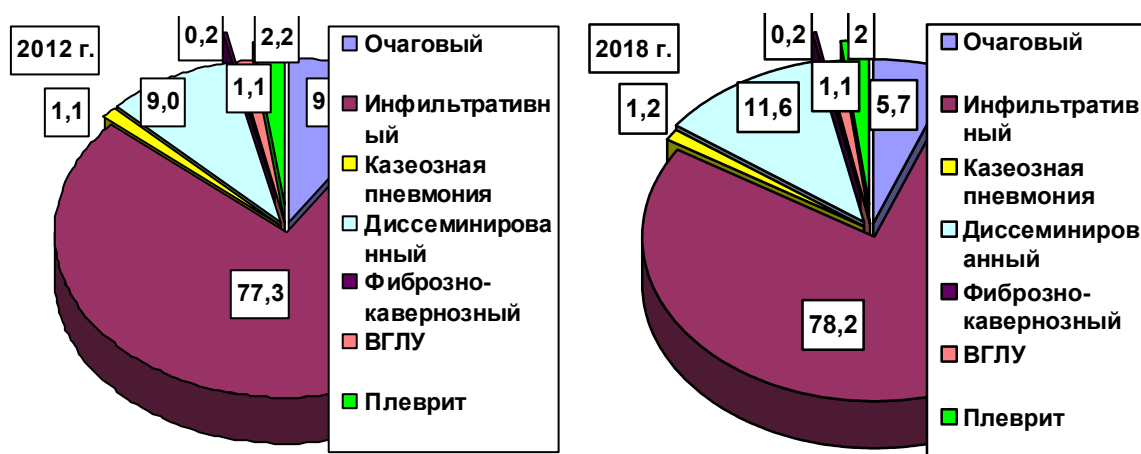


Рисунок 2. – Структура клинических форм ТОД за 2012 и 2018 гг. (%)

Наиболее частыми клиническими формами ТОД как в 2018 г., так и 2012 г. были инфильтративная – соответственно 78,2% и 77,3% и диссеминированная – соответственно 11,6% и 9,0%. Следующее ранговое место занимает очаговая форма, удельный вес которой в клинической структуре ТОД уменьшился в 2018 г. до 5,7% по сравнению с 2012 г. – 9,1%.

Статистически достоверных различий в частоте клинических форм ТОД у впервые выявленных пациентов в 2012 г. и 2018 г. не выявлено (таблицы 1, 2).

При изучении возрастного аспекта пациентов с разными клиническими формами ТОД оказалось, что инфильтративная форма чаще встречалась в возрастных группах 35-44 и 45-54 лет, диссеминированная – 35-44, 45-54, 55-64 и 65 и > лет, очаговая – 35-34 и 35-44, фиброзно-кавернозная – в старших возрастных группах, начиная с 45-54 лет.

Таблица 1. – Структура клинических форм туберкулеза органов дыхания (ТОД) у впервые выявленных пациентов в различных возрастных группах (2012 г.)

Клиническая форма	Всего		В том числе в возрасте (лет)													
			0-17		18-24		25-34		35-44		45-54		55-64		65 и >	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ТОД	3487	100	41	1,2	252	7,2	751	21,5	797	22,9	822	23,6	475	13,6	349	10,0
Из них: очаговый	317	9,1	5	1,6	45	14,2	96	30,3	83	26,2	48	15,1	29	9,1	11	3,5
Инфильтративный	2694	77,3	27	1,0	190	7,1	588	21,8	600	22,3	645	23,9	380	14,1	264	9,8
Казеозная пневмония	39	1,1	0	0,0	0	0,0	3	7,7	6	15,4	16	41,0	10	25,6	4	10,3
Диссеминированный	315	9,0	2	0,6	3	1,0	43	13,7	83	26,3	83	26,3	52	16,5	49	15,6
Фиброзно-кавернозный	7	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	57,1	1	14,3	2	28,6
ВГЛУ	38	1,1	5	13,2	3	7,9	3	7,9	3	7,9	7	18,4	0	0,0	17	44,7
Плеврит	77	2,2	2	2,6	11	14,3	18	23,4	22	28,6	19	24,7	3	3,9	2	2,6

Таблица 2. – Структура клинических форм туберкулеза органов дыхания (ТОД) у впервые выявленных пациентов в различных возрастных группах (2018 г.)

Клиническая форма	Всего		В том числе в возрасте (лет)													
			0-17		18-24		25-34		35-44		45-54		55-64		65 и >	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ТОД	1640	100	13	0,8	50	3,1	297	18,0	393	24,0	374	22,8	279	17,0	234	14,3
Из них: очаговый	93	5,7	4	4,3	4	4,3	32	34,4	26	28,0	16	17,2	5	5,4	6	6,4
Инфильтративный	1282	78,2	8	0,6	44	3,4	228	17,8	310	24,2	299	23,3	224	17,5	169	13,2
Казеозная пневмония	20	1,2	0	0	0	0	2	10,0	2	10,0	6	30,0	4	20,0	6	30,0
Диссеминированный	191	11,6	0	0	0	0	18	9,4	42	22,0	49	25,6	41	21,5	41	21,5
Фиброзно-кавернозный	4	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25,0	2	50,0	1	25,0
ВГЛУ	17	1,1	1	5,9	0	0	3	17,6	7	41,2	0	0	0	0	6	35,3
Плеврит	33	2,0	0	0	2	6,1	14	42,4	6	18,2	3	9,1	3	9,1	5	15,1

Для оценки структуры диспансерных контингентов и каналов их формирования были сопоставлены за периоды 2012-2016гг. и 2017-2018гг. среднестатистические данные о движении диспансерных контингентов (таблица 3). Из таблицы видно, что абсолютное число бактериовыделителей уменьшилось за 5 лет на 29,1%. Число впервые выявленных бактериовыделителей оказалось ежегодно ниже числа лиц, снятых с учета бактериовыделителей, то есть сокращается резервуар туберкулезной инфекции за счет новых случаев заболевания.

Среди численности контингентов бактериовыделителей доля пациентов, снятых с бациллярного учета составила в 2012-2016 гг. 52,4%, а в 2017-2018 гг. – 54,0%; впервые выявленных бактериовыделителей – соответственно 37,7% и 41,7%, пациентов с рецидивами и обострениями туберкулезного процесса – 13,0% и 12,7%, умерших пациентов с ТОД – 7,0% и 5,7%. Удельный вес прибывших из других учреждений (5,4% и 3,9%) и

выбывшие из района обслуживания ПТО (4,3% и 4,5%), не оказывают существенного влияния на движebные диспансерных контингентов ПТО.

Таблица 3. – Эффективность диспансерного наблюдения контингентов бактериовыделителей

Показатели	2012-2016 гг.	2017-2018 гг.	Изменения (%)
Абсолютное число контингентов ТОД МБТ+	26 957	7 647	
Среднегодовая численность контингентов МБТ+	5 391	3 824	-29,1
Среднегодовая численность снятых с бациллярного учета	2 827	2 085	-26,3
Среднегодовая численность в/выявленных бактериовыделителей	2 031	1 593	-21,6
Среднегодовая численность бациллярных рецидивов и обострений	704	484	-31,3
Среднегодовая численность умерших пациентов	382	217	-43,2
Прибывшие из других учреждений	291	150	-48,7
Выбывшие из районов обслуживания	233	173	-25,8
Итого: убыль контингентов (-)	-3 442	-2 475	-28,1
Пополнение контингентов (+)	+3 027	+2 226	-26,5

На основании приведенных данных можно сделать вывод, что основным каналом формирования численности диспансерных контингентов с ТОД являются лица с впервые установленным диагнозом туберкулеза с МБТ+, а также снятые с бациллярного учета.

Применение с 2012 г. новой тактики диспансерного наблюдения контингентов противотуберкулезных организаций изменило соотношение групп диспансерного учета (рисунок 3).

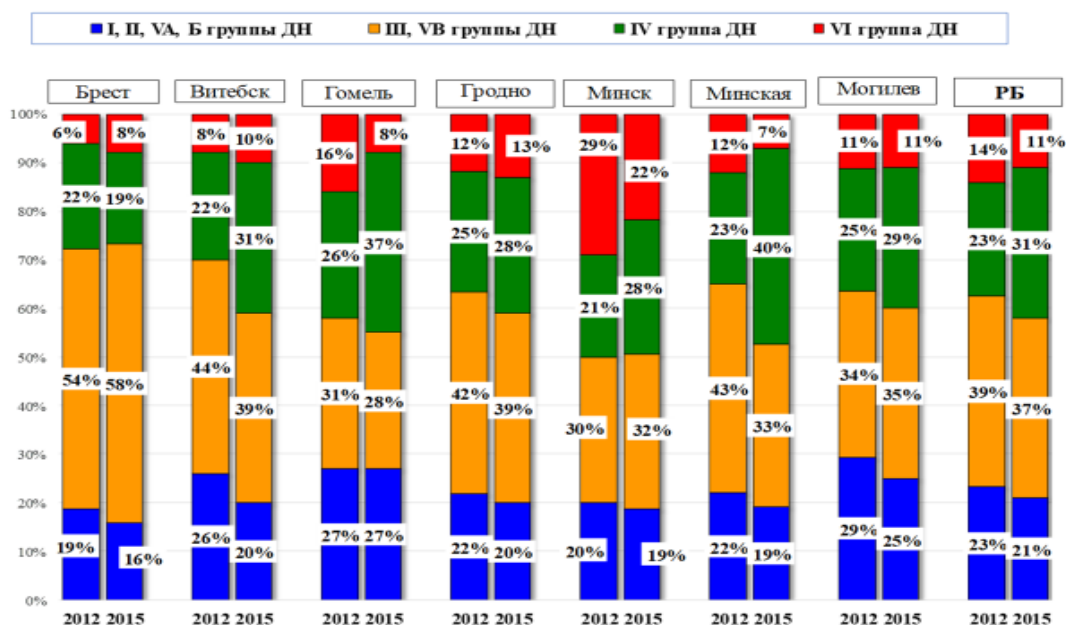


Рисунок 3. – Группы пациентов на диспансерном учете (2012 г., 2015 г.)

В 2012-2015 гг. основным контингентом диспансерного наблюдения врача-фтизиатра были лица с неактивным туберкулезом (37-39%), а в Брестской области их численность составляла 54-58%, в Витебской – 39-44%, Гродненской – 39-42%, Мин-

ской – 33-43%. На пациентов с активным туберкулезом приходилось в среднем по республике 21-23%, а в Гомельской области – 27% и Могилевской – 25-29%. Контактные лица, состоящие на учете по IV группе, составляли 23-31%, а в Брестской области – только 1-22% и г. Минске – 21-28%.

Иная картина соотношения групп диспансерного наблюдения ПТО наблюдается в современный период (2017-2018 гг.) (рисунок 4).

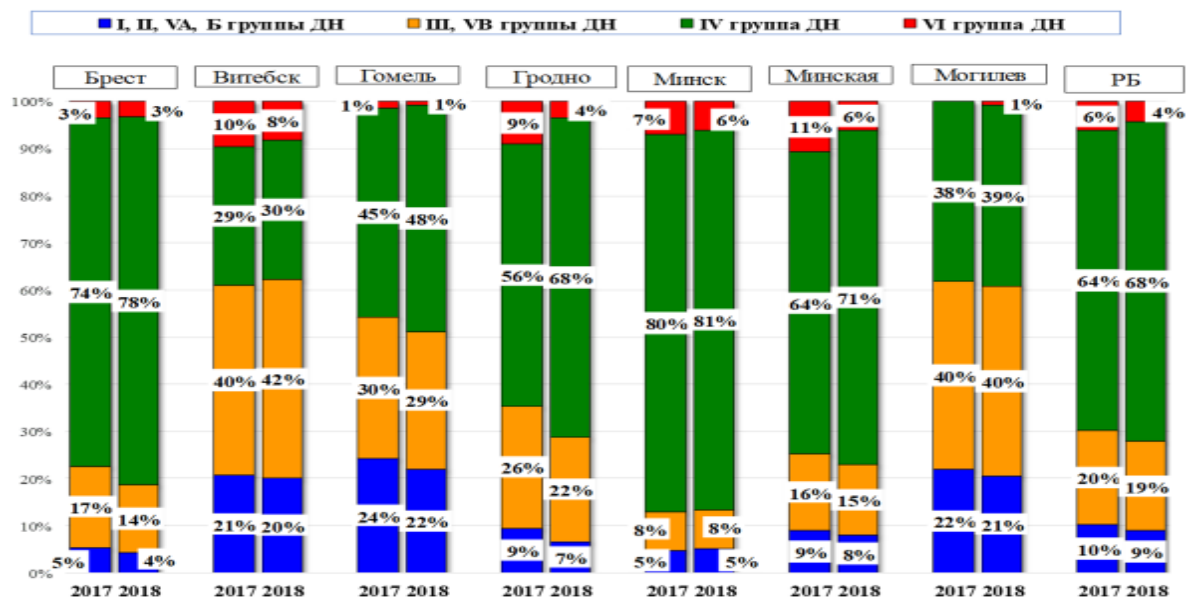


Рисунок 4. – Группы пациентов на диспансерном учете (2017 г., 2018 г.)

Основной группой диспансерного учета ПТО в последние годы является IV группа (контакты) – 64-68%, что в 2,2 раза превышает период 2012-2015 гг., а по г. Минску, Брестской и Минской областям – соответственно 80-81%, 74-78% и 64-71% или в 2,9 и 3,5 раза. Уменьшилась в 2,3 раза численность пациентов в группах активного легочного и внелегочного туберкулеза, составившего 9-10%. Лица с неактивным легочным и внелегочным туберкулезом (III, VB группы), составили 19-20%, т.е. снизились в 2 раза, а дети, инфицированные МБТ и с поствакцинальными осложнениями БЦЖ (IV группа) – 4-6%, т.е. снизились в 2,7 раза.

Заключение. Численность контингентов с активными формами туберкулеза, состоящих на учете противотуберкулезных организаций, уменьшилась в 2018 г. по сравнению с 2012 г. на 5 766 человек и составила 4 035 человек (42,5 на 100 000, в 2012 г. – 103,6 на 100 000). Среди контингентов бактериовыделителей отмечается рост множественной лекарственной устойчивости – 65,7% в 2012 г. и 78,7% в 2018 г.

Установлено, что основным каналом формирования численности контингентов с туберкулезом органов дыхания являются лица с впервые установленным диагнозом туберкулеза с бактериовыделением, а также снятые с бациллярного учета в результате эффективного лечения. Заметное влияние на численность контингентов ПТО оказывает ежегодно регистрируемая рецидивная заболеваемость туберкулезом за счет лиц III группы и снятых с диспансерного учета.

Контингенты с ВИЧ/ТБ, состоящие на диспансерном учете противотуберкулезных организаций, за последние годы (2012-2018 гг.) уменьшилась с 4,3 до 3,9 на 100000 населения. Однако, вызывает настороженность увеличение удельного веса пациентов с ВИЧ/ТБ в структуре диспансерных контингентов с активным туберкулезом за данный период с 3,9% в 2012 г. до 7,6% в 2017 г. и 8,4% в 2018 г.

Проведенный нами анализ диспансерного учета контингентов, находящихся под наблюдением фтизиатров противотуберкулезных организаций, показал, что существу-

ющая диспансерная группировка контингентов ПТО не отвечает изменившимся эпидемиологическим условиям. На основе полученных данных необходимо разработать и внедрить новую диспансерную группировку для ПТО с определением нормативных сроков пребывания пациентов на учете и рациональным использованием времени врача-фтизиатра.

Литература

1. Туберкулез в Беларуси: от эпидемии до контролируемой управляемой инфекции / Г.Л. Гуревич [и др.] // Современные направления развития респираторной медицины и фтизиатрии: сб. науч. тр. Первого съезда фтизиатров и пульмонологов Респ. Беларусь. – Минск, 2018. – С. 77-84.

2. Скрыгин, Е.М. Клиническое руководство по диагностике и лечению туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм / Е.М. Скрыгин, Г.Г. Гуревич. – Минск, 2007. – 139 с.

3. Распространенность туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза в современных условиях / П.С. Кривонос [и др.] // Современные направления развития респираторной медицины и фтизиатрии: сб. науч. тр. Первого съезда фтизиатров и пульмонологов Респ. Беларусь. – Минск, 2018. – С. 84-87.

4. Кулак, Ю.Е. Диспансерное наблюдение как метод борьбы с туберкулезом / Ю.Е. Кулак // Туберкулез современного периода: сб. материалов науч.-практ. конф. – Минск, 2012. – С. 131-136.

5. Модель противотуберкулезной помощи, ориентированная на нужды людей [Электронный ресурс]. – Копенгаген: Евробюро ВОЗ, 2017. – 53 с. – Режим доступа: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/342461/TB_Content_WHO_PRO2_rus-final-12_07_2017.pdf. – Дата доступа: 16.09.2019.

ANALYSIS OF THE DISPENSARY ACCOUNT OF CONTINGENTS UNDER THE OBSERVATION OF FTITIATERS OF TUBERCULOSIS ORGANIZATIONS IN BELARUS

Klimuk D.A., Hurevich H.L., Skrahina A.M., Kaletchic A.M., Belko H.F., Babrukevich A.L., Tishko M.A., Danjkova A.V., Iljasova A.V.

Republican Scientific and Practical Centre of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Republic of Belarus

The main channel for the formation of the number of contingents with tuberculosis of the respiratory organs are persons with a newly established diagnosis of tuberculosis with bacterial excretion, as well as those removed from the bacillary count as a result of effective treatment. A noticeable effect on the number of contingents is exerted annually by recurrent morbidity. Over the past 7 years, there has been a tendency towards an increase in multidrug resistance of tuberculosis mycobacteria in newly diagnosed patients, which reached 37.0% (32.7% in 2012). Among the contingents of bacterial isolators, there is an increase in multidrug resistance from 65.7% in 2012 up to 78.7% in 2018. The tension in the epidemic situation is supported by patients with tuberculosis from the penitentiary system – 2.8%, as well as people with alcohol dependence syndrome – 14.7%, and HIV-infected people – 6.5%.

Keywords: tuberculosis, epidemiology, relapses, clinical examination system, accounting groups.

Поступила 16.09.2019

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЭХИНОКОККОЗУ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ

Корзан А.И., Чирцова С.В., Тарелко А.К., Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В.

Государственное учреждение «Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Брест, Республика Беларусь

Резюме. По результатам анализа 83 карт эпидемиологического расследования и карт стационарного больного установлено, что среди пациентов с эхинококкозом в Брестской области преобладает кистозный вариант заболевания – 75 случаев (90,36%). Альвеолярный эхинококкоз диагностирован в 8-и случаях (9,64%). Доля местных случаев составила 93,97%, завозных 6,02%. Очаги инвазии установлены преимущественно в сельской местности (68,67%), меньше в городах (16,87%) и природных условиях (8,97%). Возраст заболевших был от 2-х до 77 лет; чаще заболевание выявлялось в возрасте от 45 до 74 лет, преимущественно женщин (72,62%). На территории области преобладают синантропные очаги инвазии в 73,49% случаев, действующие в цикле «собака→свинья→собака».

Ключевые слова: эхинококкоз, эпидемиология, клинические проявления, диагностика.

Введение. Эхинококкоз человека остаётся актуальной проблемой здравоохранения во многих странах мира и Всемирной организацией здравоохранения, а также Международным эпизоотическим бюро включён в список болезней, подлежащих радикальному искоренению. По данным ВОЗ во всем мире эта болезнь ежегодно является причиной 19 300 случаев смерти и порядка 871 000 потерянных лет жизни, скорректированных на инвалидность [1, 2].

Вызывают эхинококкоз ленточные черви рода *Echinococcus*, среди которых выделяют четыре морфологические формы заболевания: кистозный эхинококкоз, известный как гидатидная болезнь (гидатидоз) – *E. granulosus*; альвеолярный – *E. multilocularis*, поликистозный – *E. vogeli* и монокистозный – *E. oligarthrus* [3-5].

Двумя основными формами болезни у людей являются кистозный, который распространён во всем мире и альвеолярный эхинококкоз, который ограничен некоторыми районами Китая, Российской Федерации, странами континентальной Европы и Северной Америки. В Беларуси, Польше, Российской Федерации, а также в западных и центральных регионах Украины основным источником эхинококков являются больные свиньи, на юге Украины – овцы и крупный рогатый скот [1, 3, 5-7]. Синантропный цикл возбудителя *E. granulosus* (с домашними собаками, как окончательными хозяевами и овцами или другими домашними животными, как промежуточными хозяевами) преобладает как источник инфекции для человека во всем мире [1, 2, 5].

В последние 24 года в связи с внедрением современных методов диагностики эхинококкоза (ультразвуковой эхографии, компьютерной томографии, и магнитно-резонансной томографии, серологических тестов) в практике работы организаций здравоохранения Брестской области возможности выявления эхинококкоза значительно расширены, что позволяет провести анализ эпидемиологических, клинических и эколого-эпизоотологических исследований, что явилось **целью** настоящей работы [8, 9].

Материалы и методы исследования. Проведен эпидемиологический анализ 83 случаев заболеваний эхинококкозом среди жителей области. Для изучения инвазированности населения эхинококком исследовано методом иммуноферментного анализа 388 образцов сывороток крови лиц из групп риска, а также 3 327 образцов

крови от пациентов и, находящихся на диспансерном учете, переболевших. Лабораторное исследование включало определение иммуноглобулинов класса G с помощью тест-системы «Вектор-Бест» (Россия, Новосибирск). Исследования проводили на базе микробиологической лаборатории Брестского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья.

Для характеристики пораженности домашних животных использованы данные об инвазированности 4 247 870 туш свиней при проведении ветеринарно-санитарной экспертизы в лабораториях мясокомбинатов и рынков, а также результаты исследования фекалий от 12 258 собак, проведенных на базах ветеринарно-диагностических лабораторий области в период 2006-2018 гг.

Полученные цифровые данные подвергнуты статистической обработке.

Результаты исследования и обсуждение. На территории Брестской области установлены две нозологические формы эхинококкоза: кистозный и альвеолярный. В период 1995-2018 гг. зарегистрировано 83 случая (75 случаев кистозного эхинококкоза и 8 альвеолярного). Средний многолетний показатель заболеваемости эхинококкозом составил по области $0,25 \pm 0,13$ на 100 тысяч населения и находился в пределах от $0,07 \pm 0,07$ до $1,03 \pm 0,27$ на 100 тысяч. Рост количества выявленных случаев заболеваний с 2006 г. свидетельствовал скорее об улучшении качества клинической, инструментальной и лабораторной диагностики инвазии, нежели чем об ухудшении эпидемиологической ситуации.

У 78 человек ($93,97 \pm 2,61\%$) заражение яйцами гельминта произошло на территории области, у 5-ти ($6,02 \pm 2,61\%$) – за её пределами. Распределение числа заболевших и заболеваемости по годам представлено в таблице.

Таблица. – Число больных эхинококкозом и заболеваемость на 100 тысяч населения на территории Брестской области за период 1995-2018 гг.

Годы	Абс. ч.	На 100 т.	Годы	Абс.ч.	На 100 т.	Годы	Абс.ч.	На 100 т.	Годы	Абс.ч.	На 100 т.	Годы	Абс.ч.	На 100 т.
1995	1	0,07	2000	0	0	2005	1	0,07	2010	3	0,21	2015	5	0,37
1996	1	0,07	2001	1	0,07	2006	5	0,35	2011	3	0,22	2016	6	0,43
1997	0	0	2002	0	0	2007	3	0,22	2012	9	0,66	2017	14	1,03
1998	0	0	2003	2	0,14	2008	5	0,36	2013	6	0,44	2018	7	0,51
1999	0	0	2004	1	0,07	2009	6	0,43	2014	4	0,29			

Инвазия регистрировалась в организациях здравоохранения на всех 19 административных территориях области, по месту заражения очаги эхинококкоза установлены на 17 территориях (89,47%). Случаи кистозного эхинококкоза зарегистрированы на 17 из 19 административных территорий области, альвеолярного – на 4-х [4, 8, 9].

Среди заболевших доля очагов в сельских населенных пунктах была в 4 раза больше, чем в городах (соответственно $68,67 \pm 5,25\%$ и $16,87 \pm 4,24\%$), а доля очагов в природных условиях была 9,5 раза меньше, чем суммарно в селах и городах области (соответственно $8,97 \pm 3,23\%$ и $85,54 \pm 3,98\%$). Следует отметить, что из 14 заболевших городских жителей в 8 случаях заражение произошло на территориях частной жилой застройки, где содержались собаки ($57,14 \pm 15,85\%$). Заболевание регистрировалось в возрасте от 2-х до 77 лет. Чаще заболевание выявлялось в возрасте от 45 до 74 лет, на долю которого пришлось $61,90 \pm 5,33\%$ случаев, на возраст 2-14 лет – $12,05 \pm 3,57\%$, 25-29 и 35-39 лет – по $6,02 \pm 2,61\%$, что может быть проявлением отдаленных клинических

симптомов, с учетом длительной инкубации заболевания, при котором заражение могло произойти значительно раньше. В гендерных группах доминировало женское население – $72,62 \pm 4,89\%$, которое превышало удельный вес заболевших мужчин в 2,6 раза ($27,38 \pm 4,89\%$), что было связано с более частыми контактами женщин с домашними собаками при кормлении и уходе за ними. В социально-профессиональных группах доминировали лица пенсионного возраста – $36,14 \pm 5,27\%$, реже рабочих специальностей – $13,95 \pm 3,80\%$, учащиеся дошкольного и школьного возраста – $10,71 \pm 3,39\%$.

При картографировании местных 78 случаев заболеваний людей эхинококкозом установлено, что $61,54 \pm 5,51\%$ пострадавших составили лица, проживающие в населенных пунктах Столинского, Пинского, Ганцевичского, Ивановского, Березовского, Пружанского, Дрогичинского, Лунинецкого районов и г. Пинска, расположенных в бассейне Черного моря, к которому относится речная система реки Припять, правого притока Днепра. Эти территории характеризуются наибольшей заболоченностью и весенним разводьем, что способствует более длительному выживанию яиц эхинококков во внешней среде. В $24,36 \pm 4,86\%$ случаев заражение происходило на юго-западе области: г. Бресте, Брестском, Жабинковском, Каменецком, и Малоритском районах – бассейне реки Западный Буг, занимающей меньшую площадь и состоящей из малых рек и ручьев, где заболоченность территорий меньше и реже бывает весеннее разводье, чем в бассейне реки Припять; в $14,10 \pm 3,94\%$ случаев заражение происходило на северо-востоке области: г. Барановичи, Барановичском и Ивацевичском районах – бассейне реки Щара, где природные условия аналогичны, как в бассейне реки Западный Буг (рисунок) [9, 10].

Завозные случаи зарегистрированы в 5 случаях (по одному случаю из Гродненской и Минской областей Беларуси, Краснодарского края России, Волынской и Одесской областей Украины).

- 1 - 13 сл. - Столинский р-н;
- 2 - 8 сл. - Пинский;
- 3 - 5 сл. - г. Пинск;
- 4 - 7 сл. - Брестский р-н;
- 5 - 5 сл. - г. Брест;
- 6 - 4 сл. - Барановичский р-н;
- 7 - 3 сл. - г. Барановичи;
- 8 - 6 сл. - Дрогичинский р-н;
- 9 - 4 сл. - Пружанский;
- 10 - 4 сл. - Березовский р-н;
- 11 - 4 сл. - Ивацевичский р-н;
- 12 - 4 сл. - Лунинецкий р-н;
- 13 - 3 сл. - Каменецкий р-н;
- 14 - 3 сл. - Малоритский;
- 15 - 2 сл. - Ганцевичский р-н;
- 16 - 2 сл. - Ивановский р-н;
- 17 - 1 сл. - Жабинковский р-н;
- 18 - 0 сл. - Кобринский р-н;
- 19 - 0 сл. - Ляховичский р-н;
- 20 - 5 сл. - за пределами страны.



Рисунок. – Число больных эхинококкозом в районах Брестской области за период 1995-2018 гг.

Эпидемиологическая значимость эхинококкоза определяется на территории области широким распространением, тяжелым клиническим течением с сочетанными поражениями различных органов, приводящими к длительной потере трудоспособности, инвалидизации и возможности летального исхода в случаях поздней

диагностики, обширным кругом хозяев, формированием синантропных, природных и смешанных очагов.

На территории области среди пациентов с эхинококкозом преобладал кистозный вариант заболевания (75 случаев – 91,57±3,21%), в т.ч. с поражением печени 61 (81,33±4,50%), селезенки 4 (5,33±2,59%), легочной ткани 3 (4,00±2,26%), сочетанных форм инвазии: печень+легкие 2 (2,67±1,86%), печень+селезенка 1 (1,33±1,32%), почки 1 (1,33±1,32%), неустановленной локализации 4 (5,33±2,59%), что свидетельствовало о доминировании контактно-бытового и пищевого путей передачи инвазии. Альвеолярный эхинококкоз диагностирован в 8-и случаях (9,64±3,24%), среди которых в 4 случаях (50,0±18,90%) установлено поражение печени, в 2-х (25,00±16,36%) печень+легкие, в 1-ом легких (12,50±12,50%), в 1-ом (12,50±12,50%) правой доли печени с прорастанием в переднее средостение и диссеминацией по брюшной полости, с очагом в селезенке.

Клиническая картина определялась локализацией паразитарных кист, что обуславливало разнообразие и неспецифичность клинической симптоматики. Так, на ноющие боли и тяжесть в правом подреберье указывали 25,0±4,97% заболевших, высыпания на коже и зуд – 13,16±3,88%, тяжесть и боли в эпигастральной области – 11,80±3,70%, слабость и утомляемость – 10,53±3,52%, боли в животе – 5,26±2,56%, потерю веса – 5,26±2,56%, а также в отдельных случаях указывалось на боли в поясничной области, температуру тела от 37,4°C до 39°C, сухой кашель, желтушность склер и др. (от 1 до 3 случаев). Данные симптомы заболевшие отмечали за 1 год – 15 лет до установления диагноза.

Инструментальное и лабораторное подтверждение диагноза имело место во всех случаях. Использовались методы: УЗИ, КТ, МРТ, РФО, R-скопия, РКТ, гистология и биопсия, серологические тесты. Доминировало подтверждение диагноза в методе УЗИ+ИФА антигенами эхинококка в 62,25% случаев. Эозинофилия была выявлена у 30,00% больных (от 6 до 59%), повышенное СОЭ – у 59,26% (от 14 до 56 мм/ч).

При постановке реакции ИФА с антигенами эхинококка сывороток крови 66 пациентов положительная реакция в титре 1:100 отмечена у 29 человек (43,94±6,11%); 1:200 – у 17 (25,76±5,38%); 1:400 – у 10 (15,15±4,41%); 1:800 – у 1 (1,51±1,50%); 1:1600 – у 6 (9,09±3,54%); в пределах от 1:6400 до 1:25600 – у 3 (4,54±2,56%) [4].

Анализ очагов заболевания показал, что на территории области действуют преимущественно **синантропные очаги** эхинококкоза, где потенциальным источником для человека являются больные собаки, доля которых составила в эпиданамнезах 73,49±4,84% (61 случай), в т.ч. домашние собаки 90,16±3,27%, бродячие – 6,56±3,17%, охотничьи и служебные – по 1,64±1,63%. Заражение человека происходило преимущественно на частных подворьях в сельской местности и в частных домовладениях в пригородных зонах больших городов.

Промежуточными хозяевами возбудителя в синантропных очагах были преимущественно свиньи 31,15±5,93% (19 случаев), в редких случаях указывалось на наличие на подворье овец (2 случая), коз (2 случая), КРС (1 случай). Факторами передачи могли послужить руки человека, загрязнение которых происходило при контакте с собаками во время ухода за ними, а также во время работы с шерстью овец и коз, употреблении невымытых овощей и зелени с приусадебных участков, где собаки находились на беспривязном содержании, в отдельных случаях использование в питании жареной свиной печени, после удаления «пузырей». Не установлено фактов заражения в городских коммунальных квартирах, где некоторые граждане содержали собак, что может быть следствием эффективного использования антигельминтных препаратов для оздоровления домашних животных и соблюдении правил гигиены при уходе за ними. Данное исследование свидетельствует о высокой активности

синантропных очагов эхинококкозов на территории области, который поддерживается в цикле «собака-свинья-собака», где доминирующим был оральный механизм передачи инвазии, контактно-бытовой и пищевой пути передачи.

В природных очагах эхинококкоза, доля которых составила $18,07 \pm 4,22\%$ (15 случаев), заражение могло происходить при сборах дикоросов, в т.ч. клюквы на заболоченных территориях, использовании их в питании в немывтом виде, употреблении воды из болот и иных открытых природных водоисточников, а также овощей, фруктов, зелени и ягод с дачных территорий, расположенных в лесных массивах на подтопляемых и увлажненных территориях – зонах влияния рек и озер, где имеются условия к длительному выживанию яиц возбудителя во внешней среде. Данное предполагает преимущественно оральный механизм передачи инвазии, пищевой и водный пути передачи. В таких очагах могли сыграть свою роль дикие псовые и гидрофильные виды мышевидных грызунов, в результате контаминация их экскрементами зелени и овощей во время подтоплений [6, 7].

В смешанных очагах инвазии имели место случаи скормливания продуктов охотничьего промысла (тушек диких животных) домашним животным на частном подворье (собакам и свиньям). В таких условиях мог реализоваться оральный механизм передачи инвазии, контактно-бытовой и пищевой пути передачи, доля таких очагов была незначительной $2,41 \pm 1,74\%$ (2 случая).

В том числе, среди заболевших альвеококкозом, из 8 случаев заражение в одном случае могло произойти при контакте с больной собакой на частном подворье в городе – в окрестностях заболочиваемых территорий, где мог реализоваться оральный механизм передачи, контактно-бытовой и пищевой пути передачи. Свою роль в структуре очага могли сыграть гидрофильные виды мышевидных грызунов, появление лисиц в городской черте и включение в цикл домашней собаки. В трех случаях заражение альвеококком произошло в природных очагах инвазии: во время ухода за служебными собаками на территории Беловежской пуши и во время сбора лесных ягод, в т.ч. при сборе клюквы на болотах и употреблении ее в немывтом виде, где в структуре циркуляции возбудителя могли сыграть роль дикие псовые и также гидрофильные виды грызунов. В четырех случаях заражение произошло на частном подворье в сельской местности, где имелась домашняя собака [6, 7].

Все заболевшие альвеококкозом лица были местные жители, заражение в 7 случаях произошло на территории Брестской области, в одном случае на территории Гродненской области. Среди заболевших 4 мужчины и 4 женщины в возрасте от 28 лет до 74 лет; жителей городов было 5, села 3. Предполагаемые условия заражения: в селах – 4 случая, природных условиях – 3, городе (частном домовладении) – 1. Предполагаемый источник инвазии: дворные собаки в 4 случаях, употребление немывтых ягод, фруктов и овощей в 4 случаях (3 в лесных условиях, 1 на даче в лесу).

При санитарно-гельминтологическом исследовании почвы, отобранной в очагах эхинококкоза, с частных подворий спустя 5-8 лет, после предполагаемого периода заражения, находок яиц эхинококков не установлено, которые могут сохранять свою жизнеспособность во влажной среде до 1 года. При выходе в очаги (по экстренным извещениям), где имелись собаки на частных подворьях, в почве в 2-х случаях выявлены яйца эхинококков и токсокар, что позволило установить источник инвазии, своевременно провести профилактические и противоэпидемические мероприятия в очаге. В одном случае ветеринарной службой выявлены членики эхинококка у дворной собаки.

При обследовании специалистами ветеринарной службы 9 555 собак (охотничьих, используемых для выпаса скота в сельских производственных кооперативах, а также из частного сектора) поражение данной инвазией выявлено у 41 ($0,4 \pm 0,06\%$). По

результатам санитарно-ветеринарной экспертизы 4 247 870 туш свиней, проведенных в период 2006-2018 гг., эхинококкоз обнаружен в 728 тушах (0,02±0,0006%).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии больных эхинококкозом домашних животных, являющихся потенциальными источниками инвазии для контактирующих с ними людей.

Основными причинами эпидемиологического неблагополучия по эхинококкозу в области явились: несвоевременное проведение дегельминтизации домашних собак на частных подворьях в сельской местности и частных домовладениях пригородных зон больших городов, безнадзорное их содержание, отсутствие надлежащих условий для забоя свиней, выращенных для личных потребностей в частном секторе на селе, не полное уничтожение конфискатов, пораженных гидатидами, недостаточной просветительской работой с сельским населением, отсутствием действенных мер по регулированию численности и дегельминтизации бродячих собак.

Выводы:

1. На территории Брестской области установлены две нозологические формы эхинококкоза: кистозный и альвеолярный. Среди пациентов с эхинококкозом преобладает кистозный вариант заболевания в 91,57±3,21% случаев, в том числе с наибольшей долей поражения печени – 81,33±4,50%, реже селезенки, легочной ткани и почек. Альвеолярный эхинококкоз диагностирован 9,63±3,24% случаев – с локализацией в печени, легких, селезенке. К группе повышенного риска заражения следует отнести население, проживающее в сельской местности в 68,67±5,25% случаев. Заболевание чаще регистрировалось в возрасте от 45 до 74 лет в 61,90±5,33% случаев, преимущественно среди женщин – 72,62±4,89%.

2. Эндемичными территориями по эхинококкозу на территории области являются территории, расположенные в зоне влияния речных систем Припяти, Западного Буга и Щары.

3. На территории области доминируют **синантропные очаги** эхинококкоза – 73,49±4,84% случаев, где потенциальным источником для человека являются больные собаки 90,16±3,27%, **доля природных очагов** составила 18,07±4,22%, **смешанных** – 2,41±1,74%. В синантропных очагах эхинококкоза по возбудителю передача инвазии осуществлялась в цикле: «**собака** → **свинья** → **собака**», а также в отдельных случаях в циклах «**собака** → **овца** → **собака**», «**собака** → **коза** → **собака**». В очагах доминирует оральная передача, контактно-бытовой и пищевой пути передачи.

4. Все случаи заболеваний были подтверждены несколькими инструментальными и лабораторными методами диагностики. У пациентов с клиническими проявлениями эхинококкоза антитела в сыворотке крови обнаруживались в концентрации от 1:100 до 1:25 600. С учетом малой информативности клинической картины и лабораторных данных возникает необходимость более раннего использования метода иммуноферментного анализа среди групп риска на эндемичных территориях особенно детского населения, чаще имеющего контакты с собаками.

5. Проведенный эпидемиологический анализ заболеваемости по эхинококкозу позволил выявить приоритеты в целях разработки программы (плана) по профилактике инвазии на территории области.

Литература

1. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern [Electronic resource] / J. Eckert [et al.]; eds.: J. Eckert [et al.]. – Paris, France: World Organisation for Animal Health, 2001. – 265 p. – Mode of access: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42427/>. – Date of access: 30.08.2019.

2. Moro, P. Echinococcosis: a review / P. Moro, P.M. Schantz // *Int. J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 13, No. 2. – P. 125-133. doi: 10.1016/j.ijid.2008.03.037.
3. Онищенко, Г.Г. О заболеваемости эхинококкозом в Российской Федерации: письмо от 30.09.2010 № 01/14090-0-32 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://89.rospotrebnadzor.ru/documents/ros/letters/39204/>. – Дата доступа: 30.08.2019.
4. Лейкина, Е.С. Опыт изучения эпидемиологии эхинококкоза и альвеококкоза методом иммунологического обследования населения / Е.С. Лейкина, В.И. Зорихина // *Мед. паразитол.* – 1977. – № 5. – С. 592-599.
5. Эхинококкоз цистный (однокамерный) клиника, диагностика, лечение профилактика / В.П. Сергиев [и др.]. – М.: ИМПитМ им. Е.И. Марциновского Московск. мед. академ. им. И.М. Сеченова, 2008. – 33 с.
6. Шималов, В.В. Альвеококкоз в Белорусском Полесье / В.В. Шималов, В.Т. Шималов // *Паразитология.* – 2001. – № 2. – С. 145-148.
7. Шималов, В.В. Встречаемость *E. multilocularis* (*Cestoda, Taeniidae*) в юго-западной части Беларуси / В.В. Шималов // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2011. – № 4. – С. 108-112.
8. Некоторые особенности эпидемиологии эхинококкоза в Монголии и Брестской области Республики Беларусь / А.И. Корзан [и др.] // *Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы: материалы междунар. науч.-практ. конф.* – Минск, 1997. – С. 145-147.
9. Корзан, А.И. Эпидемиологическая и эколого-эпизоотологическая характеристика эхинококкоза на территории Брестской области / А.И. Корзан, Н.Т. Гиндюк, И.В. Олехнович // *Мед. журн.* – 2016. – № 1. – С. 121-123.
10. Геаграфія Брэсцкай вобласці: дапам. для студэнтаў геаграф. спецыяльнасцей ВНУ / С.В. Арцеменка [і інш.]; пад рэд. С.В. Арцеменка, А.У. Грыбко. – Мінск: Выд. цэнтр БДУ, 2002. – С. 101-111.

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION ON ECHINOCOCCOSIS IN THE BREST REGION, BELARUS

Korzan A. I., Chirtsova S. V., Tarelco A. K., Ilyasheva E. V., Sadovnikova G. V.

Brest Regional Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Brest, Republic of Belarus

According to the analysis of 83 cards epidemiological investigation cards and hospital patient found that among patients with hydatid cyst in the Brest region dominated by a cystic variant of the disease – 75 (90,36%). Alveolar echinococcosis was diagnosed in 8 cases (9.64%). Proportion of local cases was 93,97%, importations of 6.02%. Foci of infestation are found mainly in rural areas (68.67%), less in urban areas (16.87%) and natural conditions (8.97%). The age of the sick was from 2 to 77 years; more often the disease was detected at the age of 45 to 74 years, mostly women (72.62%). The region is dominated by synanthropic foci of infestation in 73,49% of cases, acting in a series of "dog→pig→dog."

Keywords: echinococcosis, epidemiology, clinical manifestations, diagnostics, Brest, Belarus.

Поступила 30.08.2019

НОРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, НОВЫЕ ГЕНОТИПЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ

¹Поклонская Н.В., ¹Лозюк С.К., ¹Амвросьева Т.В., ²Глинская И.Н.,
²Голотик Д.М., ²Федорова Е.М.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь

Резюме. В последние годы возросла заболеваемость острыми кишечными инфекциями, вызванными вирусными агентами. Норовирусы являются доминирующими агентами групповой заболеваемости и вторыми после ротавирусов – спорадической. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг норовирусов проводится в Республике Беларусь начиная с 2009 г. За этот период в стране зарегистрирована циркуляция 18 генотипов норовирусов, в том числе – 9 рекомбинантных. В статье изложены данные о вкладе норовирусов в заболеваемость ОКИ в 2017-2019 гг., а также представлена генетическая структура их популяции. Для преобладающих генотипов GII.P16/GII.4, GII.P16/GII.2, GII.P16/GII.3, GII.P7/GII.14 и GII.P7/GII.6 приведены молекулярно-эпидемиологические характеристики.

Ключевые слова: норовирус, ОКИ, групповая заболеваемость, генотип, рекомбинация.

Введение. Динамика заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ) в последние годы имеет тенденцию к росту. В 2018 г. показатель заболеваемости по сумме ОКИ составил 148,13 случаев на 100 тысяч населения (2017 г. – 148,93). Наиболее высокие показатели имели место в областных центрах и столице, где в 2018 г. зарегистрирован 9141 случай, что составило 65%. Проявление эпидемического процесса ОКИ последних лет характеризуется нарастанием значимости в их этиологии вирусных патогенов. Так, в 2018 г. в структуре ОКИ, вызванных установленными возбудителями, доля заболеваний, вызванных вирусными агентами продолжает оставаться высокой и составляет более половины всех случаев ОКИ установленной этиологии (58,5%).

Норовирусы (НоВ) являются основным этиологическим агентом групповой заболеваемости и вторым, после ротавирусов, спорадической заболеваемости острым гастроэнтеритом вирусной природы. НоВ обладают высоким уровнем генетической изменчивости, что приводит к постоянному формированию новых генотипов и геновариантов, которые могут циркулировать в популяции одновременно, или сменять друг друга. В основе этого явления лежит два основных механизма: высокий уровень нуклеотидных замен, обусловленный отсутствием корректирующей активности у РНК-зависимой РНК-полимеразы, и рекомбинация [1]. Так, установлено, что за последние 40 лет уровень нуклеотидных замен для генотипов НоВ GII.3 и GII.4 составил $4,16 \cdot 10^{-3}$ и $4,3 \cdot 10^{-3}$ на сайт в год, соответственно [2]. Для сравнения – скорость эволюции других РНК-содержащих вирусов составляет $1 \cdot 10^{-3}$ нуклеотидных замен/сайт/год [3], а ДНК-содержащих вирусов – около $1 \cdot 10^{-6}$. Механизм рекомбинации обусловлен тем, что при ко-инфекции различными генотипами НоВ геномные РНК реплицируются в непосредственной близости друг от друга, в результате чего происходит смена матрицы и образуются рекомбинантные молекулы РНК [4]. Рекомбинантные формы НоВ постоянно циркулируют в человеческой популяции. Так, в течение почти десятилетия в мире регистрировались рекомбинантные генотипы НоВ, которые имели капсидные белки различных генотипов GII (GII.1, GII.2, GII.3, GII.4 и GII.13) в сочетании с одной и той же полимеразой GII.Pb [5].

Поэтому для получения молекулярно-эпидемиологической характеристики циркулирующих геновариантов необходимо проводить идентификацию по меньшей мере 2 регионов генома – генов капсидного белка VP1 и полимеразы (RdRp) [6].

Молекулярно-эпидемиологический мониторинг НоВ проводится в Республике Беларусь начиная с 2009 г. За этот период в стране зарегистрирована циркуляция 18 генотипов НоВ, в том числе – 9 рекомбинантных. До 2015 г. большинство идентифицированных НоВ принадлежало генотипу GII.4, хотя периодически регистрировались и рекомбинантные формы. Начиная с 2016 г. рекомбинантные НоВ стали преобладающими, наиболее часто регистрировались генотипы, содержащие полимеразу GII.P16.

Целью представленной работы было установление доли НоВ среди вирусных возбудителей ОКИ в 2017-2019 гг., а также изучение генетической структуры их популяции и молекулярно-эпидемиологических особенностей преобладающих генотипов.

Материалы и методы исследования. Пробы биологического материала (10% ко-профильтрат) от пациентов с диагнозами ОКИ или ОГЭ поступали из центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья всех областей Республики Беларусь и инфекционных больниц города Минска. Исследовано 304 проб стула, полученных от пациентов при расследовании 17 эпизодов групповой заболеваемости ОКИ. Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из проб применяли набор «НК-экстра» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь) в соответствии с инструкциями по применению. Молекулярно-генетическую диагностику проводили с использованием наборов «ОКВИ-ПЦР» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь). Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторах Rotor Gene Q («Corbett Life Sciences», Австралия).

Для накопления фрагментов генома вируса с целью секвенирования использовали Fust ДНК полимеразу, 2,5x реакционный буфер, содержащий 0,5 мМ смесь дезоксинуклеотидов и 5 мМ раствор MgCl₂ (ООО «АртБиоТех», Беларусь). Амплификацию осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров [7].

Реакцию секвенирования выполняли с помощью набора «Genom Lab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman coulter, США). Детекцию результатов осуществляли на приборе CEQ 8 000 (Beckman coulter, США), анализ результатов - в MEGA7.

Молекулярное типирование проводили с помощью программного продукта национального института общественного здоровья и окружающей среды «Norovirus Genotyping Tool Version 1.0», доступного для свободного использования в режиме онлайн, и «BLAST».

В работе применены методы анализа результатов и описательной статистики с использованием встроенных графических модулей программы Excel («Microsoft Corporation», США).

Результаты и обсуждение. По результатам молекулярно-эпидемиологических исследований за 2009-2019 гг. на базе республиканской референс-лаборатории по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (далее – референс-лаборатория) накоплены данные, отражающие вклад различных возбудителей в формирование заболеваемости ОКИ (рисунок 1). Доминирующим возбудителем являлся ротавирус А, его доля составляла 27,1%. Вторыми по встречаемости были НоВ. Суммарная доля НоВ I и II геногрупп составляла 22%. Этиологический агент был установлен в 59,3% случаев.

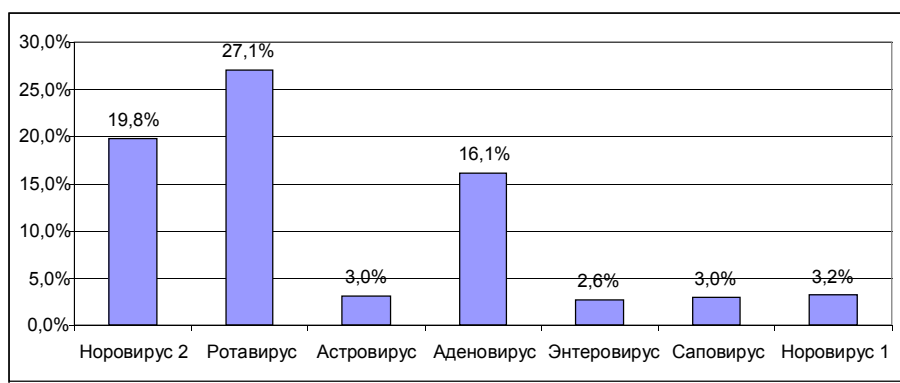


Рисунок 1. – Этиологическая структура ОКИ в Республике Беларусь (по данным исследований 2009-2019 гг., n=823)

Частота выявления основных возбудителей ОКИ в 2017-2019 гг. не существенно отличалась от общей за 10 лет (рисунок 2). При этом стоит отметить более высокую долю обнаружения аденовирусов F (24,36%), что практически сравняло их вклад с норовирусами II генотипа. В целом за последние 3 года частота успешного выявления возбудителя увеличилась на 1-5%, и, соответственно, доля пациентов, для которых была установлена этиология заболевания, выросла до 65,98%.

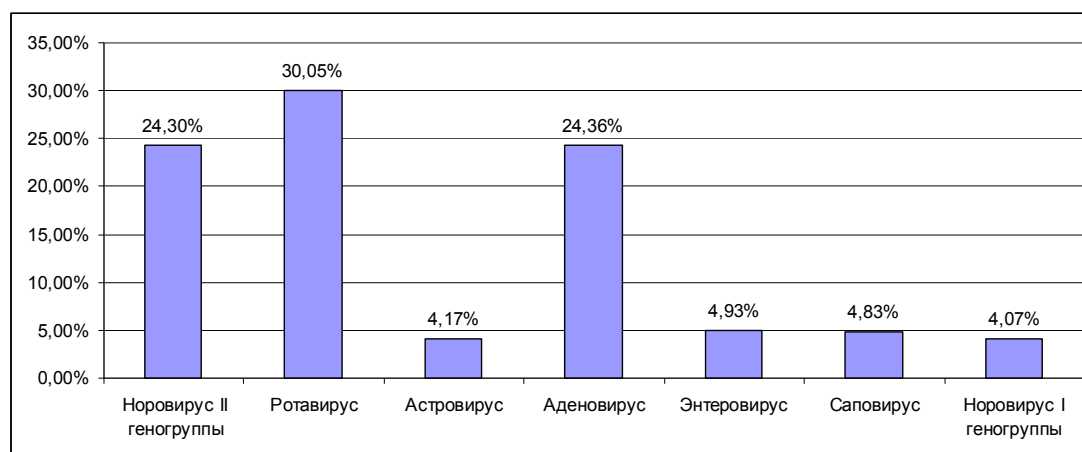


Рисунок 2. – Этиологическая структура ОКИ в Республике Беларусь (по результатам исследований 2017-2019 гг., n=194)

Накопленные референс-лабораторией за последние 10 лет результаты этиологической расшифровки групповой заболеваемости, свидетельствующие об основном вкладе НоВ в ее формирование, привели к тому, что объем диагностических исследований, направленный на выявление НоВ в последние годы увеличивается (рисунок 3). Это обусловлено также большей доступностью наборов для лабораторной диагностики норовирусной инфекции.

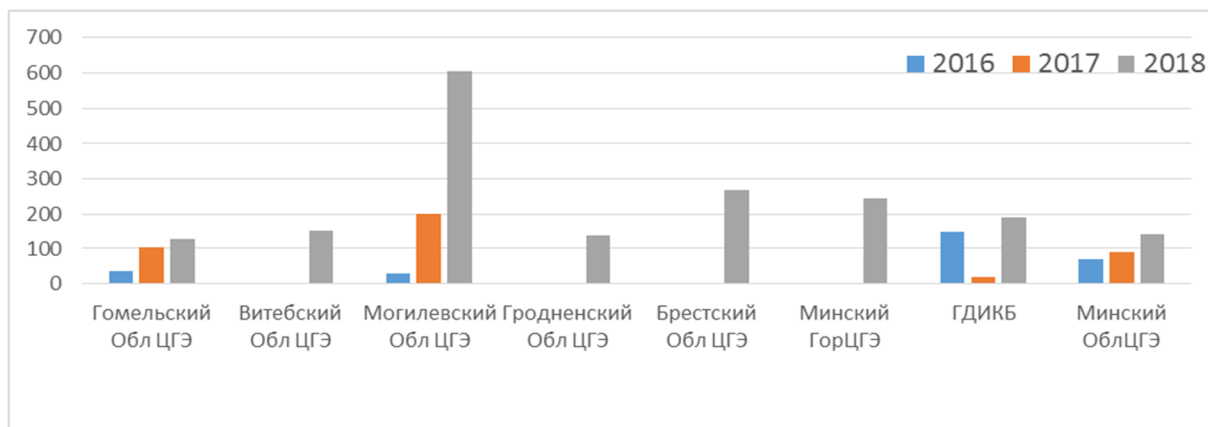


Рисунок 3. – Количество ПЦР исследований проб биологического материала на предмет детекции НоВ в течение 2016-2018 гг. в Республике Беларусь

В период 2017-2019 гг. на базе референс-лаборатории проведено этиологическое расследование 17 эпизодов групповой заболеваемости, которые были вызваны норовирусами II геногруппы (58,8%), норовирусами I геногруппы (11,8%), ротавирусом А (5,9%) и сальмонеллой (5,9%). Для трех эпизодов (17,6%) этиологию установить не удалось.

Результаты лабораторного выявления НоВ в биологическом материале пациентов по областям отражены на рисунке 4. К сожалению, вследствие нерегулярности проведения подобных исследований и значительных различий в их количестве, полученные результаты не отражают реального вклада норовирусной инфекции в формирование заболеваемости вирусными ОКИ.

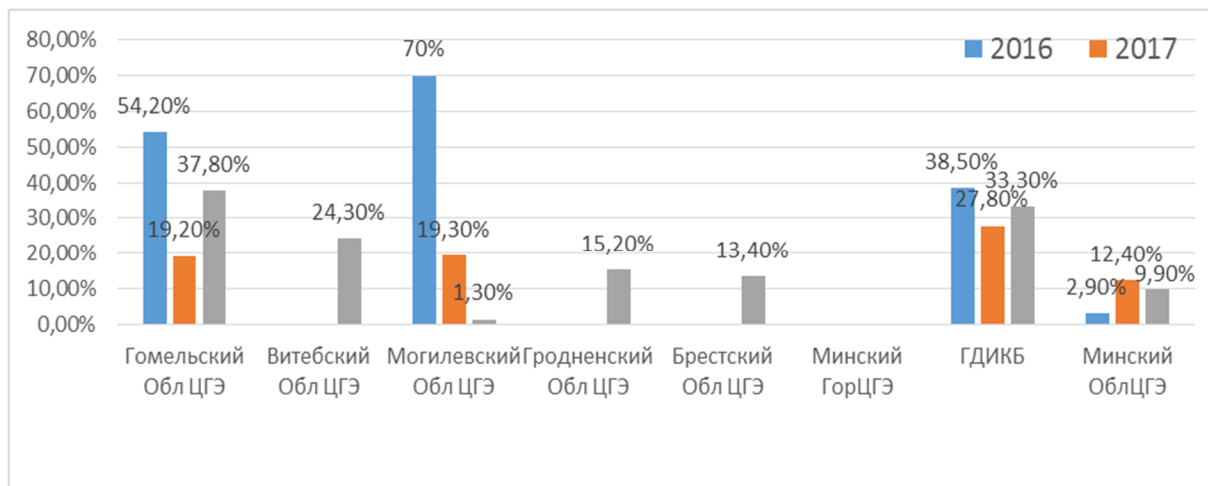


Рисунок 4. – Результаты выявления НоВ II геногруппы в различных учреждениях здравоохранения Республики Беларусь в 2016-2018 гг.

Учитывая значительное генетическое разнообразие циркулирующих НоВ и ведущую роль появляющихся новых генотипов и геновариантов в формировании групповой и росте спорадической заболеваемости норовирусной инфекцией, на базе референс-лаборатории регулярно проводится молекулярное типирование возбудителей и молекулярно-эпидемиологический мониторинг норовирусной инфекции. Обобщенные результаты, отражающие генетическое разнообразие возбудителей спорадической и групповой заболеваемости в 2017-2019 гг., представлены на рисунке 5. Как видно (рисунок 5А), наибольший вклад в спорадическую заболеваемость в 2017 г. и 2019 г. вносил генотип GI.P16/GII.4, тогда как в 2018 г. преобладал другой рекомбинантный генотип -

GII.P16/GII.3. Групповая заболеваемость в 2017 г. была вызвана генотипами GII.P16/GII.4, GII.Pe/GII.4 и GII.P17, в 2018 г. – GII.P16/GII.2, GII.P16/GII.3, GII.P7/GII.14, GII.P7/GII.6, в 2019 г. – GII.P7/GII.6 и GI.3 (рисунок 5Б).

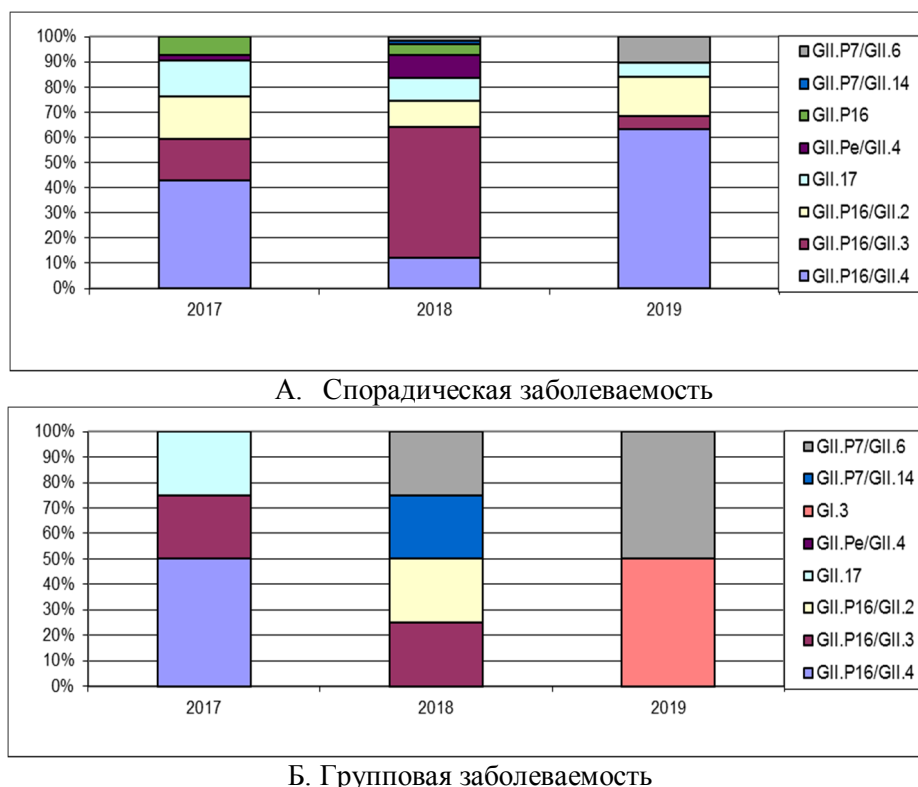


Рисунок 5. – Генотипы НоВ II геногруппы, выявленные в 2017-2019 гг.

Сравнение генетического разнообразия НоВ, вызвавших спорадическую и групповую заболеваемость между собой, позволяет отметить, что спектр циркулирующих генотипов имел как сходство, так и выраженные различия. Во-первых, среди этиологических агентов спорадической заболеваемости регистрировалось значительно большее количество генотипов (5-7), тогда как групповую заболеваемость в 2017-2019 гг. вызывали от 2 до 4 генотипов. Во-вторых, преобладающие генотипы – возбудители спорадической и групповой заболеваемости, не всегда совпадали. Только в 2017 г. генотип GII.P16/GII.4 Sydney 2012 был доминирующим этиологическим агентом как спорадической, так и групповой заболеваемости. В 2018 г. у пациентов со спорадическими случаями инфекции чаще всего выявлялся НоВ GII.P16/GII.3, тогда как групповую заболеваемость с равной частотой вызывали 4 генотипа, перечисленные выше. Причем генотипы GII.P16/GII.2, GII.P7/GII.14, GII.P7/GII.6, вызвавшие в 2018 г. эпизоды групповой заболеваемости, были минорными среди пациентов со спорадическими случаями инфекции. Аналогичная ситуация наблюдалась и в 2019 г.: эпизоды групповой заболеваемости были обусловлены генотипами, не являющимися широко распространенными.

Учитывая значительную роль генотипов НоВ GII.P16/GII.4, GII.P16/GII.2, GII.P16/GII.3, GII.P7/GII.14 и GII.P7/GII.6 в формировании заболеваемости ОКИ в 2017-2019 гг. был проведен их генетический анализ и установлены основные характеристики.

Три доминировавших в 2017-2019 гг. генотипа НоВ (GII.P16/GII.4, GII.P16/GII.2 и GII.P16/GII.3) были рекомбинантными и содержали ген полимеразы одного и того же генотипа – GII.P16. Генотип НоВ GII.P16/GII.4, содержал ген капсидного белка пандемического геноварианта GII.4 Sydney 2012. Вирусы, ген капсида которых принадлежал к тому же геноварианту, циркулировали в Республике Беларусь начиная с 2014 г. и вносили заметный вклад в спорадическую и групповую заболеваемость.

В 2016 г. на территории республики появился рекомбинантный генотип GII.P16/GII.4 Sydney 2012. Данный генотип не содержит уникальных аминокислотных замен в капсиде, которые позволили бы ему избегать коллективного иммунитета, сформировавшегося к ранее циркулировавшим HoV, имевшим тот же ген капсидного белка – GII.P4 New Orleans / GII.4 Sydney 2012 и GII.Pe/GII.4 Sydney 2012 [8]. В связи с этим можно предположить, что его появление и широкое распространение в популяции обусловлено геном полимеразы GII.P16. Два других доминировавших в последние годы генотипа HoV – GII.P16-GII.2 и GII.P16/GII.3 также содержали ген РНК-зависимой РНК-полимеразы генотипа GII.16. Эволюционно ген полимеразы GII.P16, который содержали рекомбинантные изоляты в 2017-2019 гг., достаточно сильно отличался от полимеразы GII.P16, встречавшейся у HoV ранее. Нуклеотидная последовательность этого гена имела около 5% различий. При этом ген полимеразы разных рекомбинантных генотипов 2017-2019 гг. содержал всего от 0 до 1,5% различий в нуклеотидной последовательности. Анализ вирусов, циркулировавших в последние годы в мире, показал, что полимеразы этого же типа получила широкое распространение и среди других циркулировавших генотипов HoV: GII.1, GII.10, и GII.12. Проведенный анализ полногеномной последовательности различных рекомбинантных HoV, в состав которых входила полимеразы GII.P16, показал наличие уникальных аминокислотных замен в регионах, кодирующем неструктурные белки (NS1/2, NS4) и VP2, которые могли играть роль в возникновении иммунного антагонизма, а также влиять на уровень и надежность репликации вируса, тем самым способствуя его широкому распространению в популяции [8, 9].

Два других новых для нашей страны и появившихся в конце 2018 г. HoV (генотипы GII.P7/GII.14 и GII.P7/GII.6) также имели рекомбинантные геномы, в которых ген капсидного белка принадлежал к разным генотипам (GII.14 и GII.6), а ген полимеразы – к одному и тому же генотипу (GII.P7). Рекомбинантный генотип GII.P7/GII.6, впервые выявленный в конце 2018 г. в Республике Беларусь, периодически являлся причиной вспышек по всему миру, включая Китай (2015 г.), Южную Африку и Уругвай (2014 г.), а также в 2018 г. был причиной 5% вспышек в США (по данным CDC). Анализ гена полимеразы GII.P7 показал, что после рекомбинации данный ген эволюционировал независимо от предковой формы [10].

Генотип GII.P7/GII.14, также выявленный зимой 2018 г., обладал значительной степенью сходства (98-99%) с изолятами, идентифицированными на обширных территориях в течение длительного времени – в ЮАР (2013 г.), России (2016 г.), Китае и Австралии (2017 г.). Несмотря на то, что GII.P7/GII.14 и GII.P7/GII.6 были выявлены при расшифровке групповой заболеваемости, при спорадической – они практически не встречались. Полученные результаты позволяют предположить отсутствие у этих рекомбинантов значительного эпидемического потенциала, так как за достаточно длительный период их циркуляции, не получено данных о вызванных ими осложнениях эпидемиологической ситуации. Следует отметить, что несмотря на наличие у обоих геновариантов полимеразы GII.P7, степень идентичности по этому гену составила 89%. Кроме того, сравнение гена полимеразы обоих генотипов (GII.P7/GII.14 и GII.P7/GII.6) с предковым геном прототипного штамма HoV GII.P7/GII.7 Saitama U4 показало, что степень сходства между ними составила 93,4-94,3%, соответственно. Это обстоятельство позволяет предположить, что исследуемые генотипы получили ген полимеразы от предкового в результате двух независимых эпизодов рекомбинации и в дальнейшем эволюционировали параллельно.

Заключение. HoV – одни из преобладающих в нашей стране возбудителей ОКИ вирусной этиологии. Важная роль HoV в формировании эпидемического процесса обусловлена, в первую очередь, их основным вкладом в формирование групповой заболеваемости. Биологические особенности HoV приводят к тому, что в стране регулярно происходит смена доминирующих и появление новых генотипов и геновариантов, которые

играют основную роль в возникновении групповой заболеваемости. Несмотря на это, сегодня приходится констатировать, что диагностика норовирусной инфекции в Республике Беларусь до сих пор проводится нерегулярно и в недостаточном объеме, что не позволяет проводить качественный эпидемиологический надзор. Республиканская референс-лаборатория по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии осуществляет молекулярно-эпидемиологический мониторинг возбудителей, однако из-за отсутствия регулярно проводимой лабораторной диагностики норовирусной инфекции в ее опорных базах (в региональных лабораториях), получаемая информация часто носит ретроспективный характер, что не способствует принятию оперативных и адекватных ситуации мер по предотвращению широкого распространения генотипов НоВ с высоким эпидемическим потенциалом.

Литература

1. White, P.A. Evolution of norovirus / P.A. White // Clin. Microbiol. Infect. – 2014. – Vol. 20, No. 8. – P. 741-745.
2. Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period / D. Boon [et al.] // J. Virol. – 2011. – Vol. 85, No. 17. – P. 8656-8666.
3. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants / S. Duffy [et al.] // Nat. Rev. Genet. – 2008. – Vol. 9, No. 4. – P. 267-276.
4. Contribution of intra- and interhost dynamics to norovirus evolution / R.A. Bull [et al.] // J. Virol. – 2012. – Vol. 86, No. 6. – P. 3219-3229.
5. A multi-site study of norovirus molecular epidemiology in Australia and New Zealand, 2013-2014 / K.L. Lim [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, No. 4. – e0145254. doi: 10.1371/journal.pone.0145254
6. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping / A. Kroneman [et al.] // Arch. Virol. – 2013. – Vol. 158, No. 10. – P. 2059-2068.
7. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses / S. Kojima [et al.] // J. Virol. Meth. – 2002. – Vol. 100. – P. 107-114.
8. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission / C. Ruis [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, No. 6. – e0179572.
9. Emerging novel GII.P16 noroviruses associated with multiple capsid genotypes / L. Barclay [et al.] // Viruses. – 2019. – Vol. 11, No. 6. – pii: E535. doi: 10.3390/v11060535.
10. Bruggink, L.D. The comparative molecular epidemiology of GII.P7_GII.6 and GII.P7_GII.7 norovirus outbreaks in Victoria, Australia, 2012-2014 / L.D. Bruggink, J.M. Moselen, J.A. Marshal // Intervirology. – 2016. – Vol. 59, No. 1. – P. 60-65.

NOROVIRAL INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS: LABORATORY DIAGNOSTICS, MOLECULAR EPIDEMIOLOGY, NEW CURRENT GENOTYPES

¹Poklonskaya N.V., ¹Laziuk S.K., ¹Amvrosyeva T.V., ²Glinskaya I.N.,
²Golotik D.M., ²Fedorova E.M.

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

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

In recent years, the incidence of acute intestinal infections caused by viral agents has increased. Noroviruses are the dominant agents of group morbidity and second after rotaviruses are sporadic. Molecular and epidemiological monitoring of noroviruses has been carried out in the Republic of Belarus since 2009. During this period, the circulation of 18 genotypes of noroviruses, including 9 recombinant ones, has been registered in the country. The article presents data on the contribution of noroviruses to the incidence of acute intestinal infections in 2017-2019, and also presents the genetic structure of their population. For the prevailing genotypes GII.P16 / GII.4, GII.P16 / GII.2, GII.P16 / GII.3, GII.P7 / GII.14 and GII.P7 / GII.6, the molecular epidemiological characteristics are given.

Keywords: norovirus, acute intestinal infections, group incidence, genotype, recombination.

Поступила 16.09.2019

ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ НАСЕЛЕНИЯ г. МИНСКА

Приложинская Е.А., Хомченко Е.А., Бабуркина О.С., Гулик Г.Н., Радкевич С.В.

*Государственное учреждение «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»,
Минск, Республика Беларусь*

Резюме. В данной статье представлена эпидемиологическая ситуация по ВИЧ-инфекции за 1-е полугодие 2019 г. в г. Минске.

Ключевые слова: ВИЧ, ВИЧ-инфекция, люди, живущие с ВИЧ, Минск, Беларусь.

Введение. ВИЧ-инфекция – многогранное социально значимое хроническое медикаментозно управляемое инфекционное заболевание, сочетающее в себе не только медицинские аспекты (такие как профилактика, диагностика, лечение, недопущение развития терминальной IV стадии заболевания – СПИДа, предупреждение передачи ВИЧ от матери ребенку), но и социальные, правовые аспекты, вопросы преодоления стигмы и недопущения дискриминации.

По данным Объединенной программы ООН по ВИЧ/СПИД (далее – ЮНЭЙДС) в 2017 г. общемировое число людей, живущих с ВИЧ (далее – ЛЖВ), составляло 36,9 млн. человек, 21,7 млн. ЛЖВ получают антиретровирусную терапию (далее – АРТ), число новых случаев заражения ВИЧ в 2017 г. составило 1,8 млн. человек [1].

Цель исследования – изучение эпидемиологической ситуации по заболеваемости ВИЧ-инфекцией населения г. Минска.

Материалы и методы исследования: статистический.

Результаты и их обсуждение. В Республике Беларусь официальный статистический учёт случаев ВИЧ-инфекции начался с 1987 г. За весь период статистического наблюдения 1987-01.07.2019 в г. Минске зарегистрировано 5 528 случаев ВИЧ-инфекции. Показатель распространенности ВИЧ-инфекции в г. Минске составил 237,2 на 100 тыс. населения и остается на уровне среднереспубликанского показателя ($p < 0,05$). По распространенности г. Минск занимает 3 место среди регионов Республики Беларусь после Гомельской и Минской областей. По состоянию на 01.07.2019 в г. Минске с ВИЧ-положительным статусом проживает 4 790 человека.

Многолетняя динамика заболеваемости ВИЧ-инфекцией за последние 12 лет характеризовалась выраженной тенденцией к росту заболеваемости со средним Темпом прироста = +16,1%. Основной причиной ухудшения эпидемической ситуации в г. Минске в 2014-2015 гг. явилась активизация немедицинского парентерального пути передачи ВИЧ среди лиц, употребляющих инъекционные наркотики (далее – ЛУИН). Пусковым механизмом для интенсивного распространения ВИЧ-инфекции в этой группе явилось изменение структуры потребляемых наркотических веществ и переход на использование синтетических психостимуляторов. Особенностью использования синтетических психостимуляторов является высокая кратность их инъекционного введения в течение суток от 8 до 20 раз (что значительно повышает риск передачи ВИЧ-инфекции инъекционным путём) [2].

За 1-е полугодие 2019 г. в г. Минске выявлено 268 новых случаев ВИЧ-инфекции, показатель заболеваемости составил 13,5 на 100 тыс. населения и остается на уровне аналогичного периода 2018 г. (293 случая – 14,8 на 100 тыс. населения) ($p < 0,05$).

Если в 2015 и 2016 гг. доминирующим путем передачи являлся парентеральный инъекционный при введении наркотических веществ (70,5% и 60% соответственно), то в 2019 г. лидирует половой путь передачи – 63,8%.

Несмотря на наметившуюся тенденцию к снижению инъекционного пути при употреблении наркотических веществ, в г. Минске в за 1-е полугодие 2019 г. выявлен самый высокий удельный вес данного пути передачи среди всех регионов страны (г. Минск – 35,1%, Республике Беларусь – 17,7%).

В 1-м полугодии 2019 г. в структуре заболеваемости по полу преобладали мужчины – 71,6%, удельный вес женщин составил 28,4%. Средний возраст вновь выявленных ВИЧ-положительных пациентов – 37 лет. Каждый второй пациент находился в возрастной группе 30-39 лет.

Проблема ВИЧ-инфекции касается всех социально-профессиональных групп населения. За 1-е полугодие 2019 г. половина случаев ВИЧ-инфекции выявлена среди работающего населения (47,8%), значимый удельный вес занимали лица без определенной деятельности – 27,6% и выявленные в местах лишения свободы – 8,2%.

В 2018 г. наибольшее число новых случаев зарегистрировано во Фрунзенском районе г. Минска – 68 случаев (25,4%) и Заводском районе г. Минска – 56 случаев (20,9%). По уровню заболеваемости наиболее высокие показатели были зарегистрированы в Заводском районе г. Минска (23,9 на 100 тыс. населения), Партизанском районе г. Минска (19,5 на 100 тыс. населения) и во Фрунзенском районе г. Минска (14,7 на 100 тыс. населения). По уровню распространенности лидирует Заводской район г. Минска – 367,1 на 100 тыс. населения.

Для дальнейшего сохранения здоровья населения г. Минска, сдерживания эпидемии ВИЧ-инфекции в концентрированной стадии (распространённость ВИЧ превышает 5% в отдельных уязвимых группах населения) и снижения уровня смертности от IV стадии заболевания, постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 14 марта 2016 г. № 200 утверждена подпрограмма 5 «Профилактика ВИЧ-инфекции» Государственной программы «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016-2020 годы (далее – Подпрограмма 5).

Основными задачами подпрограммы 5 являются: обеспечение всеобщего доступа к диагностике, лечению, уходу и социальной поддержке в связи с ВИЧ-инфекцией, в том числе в пенитенциарной системе; элиминация вертикальной передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку и случаев передачи ВИЧ, связанных с оказанием медицинской помощи; снижение распространения ВИЧ в группах населения с высоким риском инфицирования [3].

Обеспечение всеобщего доступа к диагностике, лечению, уходу и социальной поддержке в связи с ВИЧ-инфекцией. Мировая стратегия «Лечение – как профилактика» – клинически и эпидемиологически обоснована. С 1 января 2018 г. Беларусь перешла на универсальный доступ к АРТ, все ВИЧ-положительные пациенты имеют доступ к лечению вне зависимости от стадии заболевания и от уровня CD4 клеток.

Оценочное число ЛЖВ в г. Минске составляет 5 630 человек (по расчетным данным статистической программы СПЕКТРУМ). К концу 2020 г. поставлена задача по достижению стратегической цели ЮНЕЙДС «90-90-90» [4]. С ноября 2018 г. начата реализация «Плана мероприятий по обеспечению достижения стратегической цели ЮНЕЙДС «90-90-90» в г. Минске на 2018-2020 годы» (далее – План).

В г. Минске на 01.07.2019 достигнуты следующие глобальные показатели: 85% (4 790 человека) – 75,4% (3 120 человек) – 78,5% (2 450 человек).

Знание своего ВИЧ-статуса является первым этапом каскада медицинской помощи ВИЧ-положительным пациентам. Ежегодно в организациях здравоохранения в г. Минске тестируется на ВИЧ более 300 тысяч человек – 16% от численности населения. В рамках совершенствования системы лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции в государственных учреждениях здравоохранения активно применяется экспресс-тестирование на ВИЧ по крови (за 1-е полугодие 2019 г. протестировано 5648 человек, в т.ч. у 133 человек получен положительный результат – 2,4%).

В рамках плана мероприятий по обеспечению достижения стратегической цели ЮНЕЙДС «90-90-90» в г. Минске на 2018-2020 гг. с ноября 2018 г. осуществляется проведение на добровольной основе сплошного скрининга на ВИЧ населения г. Минска в

возрасте 30-49 лет при обращении за медицинской помощью методом экспресс-тестирования по крови. За 1-е полугодие 2019 г. обследовано 3 251 человек (в т.ч. у 101 получен положительный результат – 3,1%).

Элиминация вертикальной передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку и случаев передачи ВИЧ, связанных с оказанием медицинской помощи. В настоящее время определены методы эффективной профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку [5]. За 1-е полугодие 2019 г. родоразрешение состоялось у 37 ВИЧ-позитивных женщин, родилось 37 ребенка.

Снижение распространения ВИЧ в группах населения с высоким риском инфицирования. В рамках выполнения Подпрограммы 5 важнейшим мероприятием было реализация государственного социального заказа в сфере проведения профилактических мероприятий по предупреждению социально опасных заболеваний и ВИЧ-инфекции. В 2019 г. реализуется государственный социальный заказ в части, касающейся предоставления негосударственным некоммерческим организациям субсидий на оказание услуг, направленных на формирование приверженности людей, живущих с ВИЧ, к медицинскому наблюдению и лечению, паллиативной медицинской, первичной медицинской, медико-социальной помощи.

Заключение. Многолетняя динамика заболеваемости ВИЧ-инфекцией за последние 12 лет характеризовалась выраженной тенденцией к росту заболеваемости. За 1-е полугодие 2019 г. в г. Минске выявлено 268 новых случаев ВИЧ-инфекции, показатель заболеваемости составил 13,5 на 100 тыс. населения и остается на уровне аналогичного периода 2018 г. (293 случая – 14,8 на 100 тыс. населения) ($p < 0,05$).

В 1-м полугодии 2019 г. в структуре заболеваемости по полу преобладали мужчины. Средний возраст вновь выявленных ВИЧ-позитивных пациентов был равен 37 лет. Каждый второй пациент находился в возрастной группе 30-39 лет. По уровню распространенности лидирует Заводской район г. Минска – 367,1 на 100 тыс. населения. Доминирующим путем передачи ВИЧ-инфекции в 2018 г. являлся половой путь передачи – 63,8%. Несмотря на наметившуюся тенденцию к снижению инъекционного пути при употреблении наркотических веществ, в г. Минске выявлен самый высокий удельный вес данного пути передачи среди всех регионов страны.

Литература

1. Информационный бюллетень. Глобальная статистика ВИЧ за 2017 год // ЮНЭЙДС [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_ru.pdf. – Дата доступа: 12.03.2019.
2. Шилейко, И. Д. «Дизайнерские» наркотики – проблема современного общества / И. Д. Шилейко // Мед. знания. – 2014. – № 4. – С. 24-26.
3. Постановление Совета Министров от 14.03.2016 № 200 «Об утверждении Государственной программы «Здоровье народа и демографическая безопасность Республики Беларусь» на 2016-2020 годы» [Электронный ресурс] / Совет Министров Республики Беларусь. – 2016. – Режим доступа: <http://www.government.by/upload/docs/filecdf0f8a76b95e004.PDF>. – Дата доступа: 12.03.2019.
4. 90-90-90 An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. UNAIDS / JC2684 (English original, October 2014) [Electronic resource]. – 2014. – Mode of access: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en.pdf. – Date of access: 12.03.2019.
5. Садовникова, В.Н. Эпидемиологические особенности ВИЧ-инфекции у беременных женщин и рожденных ими детей / В.Н. Садовникова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 1. – С. 8-13.

FEATURES OF THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION ON HIV INFECTION MORBIDITY IN MINSK CITY

Prilozhinskaya E.A., Homchenka E.A., Baburkina V.S., Hulik H.N., Radkevich S.V.

Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus

This paper presents the epidemiological situation for the HIV infection morbidity in the 1st half of 2019 in Minsk City, Belarus.

Keywords: HIV infection, people living with HIV, Minsk City, Belarus.

Поступила 30.08.2019

СТРУКТУРА СТАЦИОНАРНЫХ ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ В 2018 ГОДУ

Саварина В.А., Мицура В.М., Малаева Е.Г., Терешков Д.В., Поддубный А.А.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Была изучена структура госпитализированных пациентов в г. Гомеле в 2018 г. с циррозами печени по следующим признакам: этиология, пол, возраст, прогностический класс по Чайлд-Пью, кратность повторных госпитализаций, длительность пребывания в стационаре, активность заболевания, значение лабораторных показателей.

Ключевые слова: цирроз печени, этиология, структура, Гомельская область, Беларусь.

Введение. Цирроз печени (ЦП) является тяжелым инвалидизирующим заболеванием, часто у людей молодого трудоспособного возраста [1, 2]. Среди пациентов гастроэнтерологического профиля ЦП является лидирующей причиной смертности, при этом отмечается стабильный рост частоты данной патологии в Республике Беларусь.

Стационарное лечение пациентов с циррозами вирусной этиологии (гепатит В – HBV, гепатит С – HCV) происходит в инфекционном гепатологическом стационаре, пациенты с циррозами другой этиологии госпитализируются в гастроэнтерологический стационар. В большинстве случаев цирроз возникает на фоне хронических вирусных гепатитов, либо злоупотребления алкоголем, часто встречаются сочетанные вирусно-алкогольные ЦП. Определение этиологии цирроза необходимо как для прогноза, так и для выбора лечения [2, 3]. Известно, что при устранении этиологического фактора цирроз может быть обратим [4]. Также важно оценить стадию ЦП, поскольку при декомпенсации 5-летняя выживаемость составляет около 50% [2, 5].

В связи с этим важно оценить структуру госпитализированных пациентов в инфекционном и гастроэнтерологическом стационарах для улучшения оказания помощи этой группе пациентов.

Материалы и методы. Проанализированы истории болезни пациентов с диагнозом цирроза печени с января по декабрь 2018 г. включительно в трех стационарах: отделение хронических вирусных гепатитов Гомельской областной инфекционной клинической больницы (ГОИКБ), гастроэнтерологические отделения Гомельской городской клинической больницы № 3 (ГГКБ № 3) и Гомельской областной клинической больницы

(ГОКБ). Всего изучено 436 случаев госпитализации, из них в ГОИКБ – 166, в ГКБ №3 – 207, в ГОКБ – 63.

Всего наблюдались 353 пациента: 112 мужчин (53%) и 99 женщин (47%), в возрасте от 20 до 86 лет (средний возраст $55,0 \pm 0,7$ лет). Было 83 случая повторных госпитализаций: 22 – в ГОИКБ, 46 – в ГКБ №3 и 15 – в ГОКБ.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statistica V.6.1. Для сравнения применялись тесты Манна-Уитни, χ^2 .

Результаты и обсуждение. Проанализирована возрастная структура у 353 пациентов: до 30 лет – 4 чел. (1,1%), 30–39 лет – 27 чел. (7,6%), 40–49 лет – 74 чел. (21%), 50–59 лет – 125 чел. (35,1%), 60–69 лет – 93 чел. (35,4%), 70 лет и старше – 30 чел. (8,5%). Средний возраст мужчин (54,6 года) и женщин (55,7 года) статистически не различался ($p=0,52$; тест Манна-Уитни). Следует отметить, что лиц трудоспособного возраста было более половины: 126 из 170 мужчин (74,1%) и 69 из 184 женщин (37,5%), различие статистически значимо ($\chi^2=8,83$; $p=0,003$). Инвалидность имела у 34 мужчин (20%), причем 27 из них (79,4%) были трудоспособного возраста. У женщин инвалидность имела у 28 из 184 (15,2%), из них трудоспособного возраста – 4 человека (14,4%). Неработающих лиц было 262 из 353 человек (74,2%), из них 116 человек (44,3%) трудоспособного возраста: 71 мужчина (61,2%) и 45 женщин (38,8%).

Впервые за анализируемый период были выявлены циррозы печени у 31 человека: 14 мужчин и 17 женщин. Класс тяжести А по Чайлд-Пью был установлен у 8 пациентов (25,8%), класс В – 14 (45,2%), класс С – 9 (29%). Проанализирована этиология впервые выявленных циррозов печени. Из 31 пациента маркеры вирусных гепатитов имели 6 человек (19,4%), из них этиология: вирусный гепатит С (HCV) – у 2 пациентов, HCV + метаболический – 1 чел., HCV + алкогольный – 1 чел., вирусный гепатит В (HBV) + метаболический – 1 чел., HBV – 1 чел. У 25 пациентов (80,6%) маркеры вирусных гепатитов не были выявлены. Алкоголь как причина цирроза печени указан у 4 человек (12,9%). Аутоиммунный гепатит выявлен у 1 пациента, у остальных 20 (64,5%) причина цирроза осталась неустановленной: «криптогенный», «неуточненный» цирроз печени.

Из 436 случаев госпитализации проанализирована этиологическая структура диагнозов ЦП. Чаще всего (51%) это был цирроз неуточненной этиологии под различными названиями: «криптогенный», «неуточненный», «невирусный». Также часто (37,5%) встречался хронический вирусный гепатит С (как монопатология – 51%, в сочетании с токсико-метаболическим – 40%, с алкогольным поражением – 3%, с аутоиммунным поражением – 2%, HCV+HBV – 2%, HCV+HBV в сочетании с токсико-метаболическим циррозом – 2%).

Третьим по частоте встречаемости был «токсико-метаболический» цирроз печени – 18%. При этом в 84% он сочетался с гепатитом С, а как моно-этиология встречался в 5% случаев, в 7% было сочетание с HBV, в 4% – с HCV и токсико-метаболическим поражением.

Первичный билиарный цирроз отмечался у 6% пациентов, гепатит В – у 5%. Алкогольный цирроз зарегистрирован у 3% (из них 58% – чистое алкогольное поражение печени, 42% – сочетание с HCV).

В историях болезни отражался алкогольный анамнез пациента. У 9 пациентов (2,6%) имелись указания о наличии алкогольной зависимости или о злоупотреблении алкоголем, в то же время указание на алкоголь в диагнозе имелось только у 3 из них. При наличии признаков злоупотребления алкоголем у 3 пациентов выставлен диагноз «криптогенный» цирроз, у 2 пациентов – вирусный, в 1 случае – токсико-алиментарный. Это говорит о недоучете алкогольного фактора в формулировке диагноза цирроза печени.

Длительность стационарного лечения составила в среднем 13,8 дней. Самые короткие сроки отмечены для гепатита В – 11,3 койко-дня. Самый длительный срок (18,2 койко-дня) наблюдается для смешанных циррозов при наличии «токсико-метаболической» этиологии.

Анализировался класс тяжести циррозов по Чайлд-Пью. Класс А выставлен у 35% пациентов, класс В – у 44%, класс С – у 21%, при этом класс С чаще всего выставлялся при гепатите С (21,9%).

У обследованных пациентов проанализировано время с момента постановки диагноза цирроза печени до настоящей госпитализации. Эти сроки составили от 0 (впервые выявленный ЦП) до 28 лет, в среднем – 2,5 лет.

Уровни АЛТ были повышены у 195 пациентов (44,8%), в том числе у 43 – выше 3 норм, а у 3 – выше 10 норм.

Известно, что для алкогольного поражения печени характерно повышение гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), превышающее значения аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ), а для хронической алкогольной интоксикации характерно повышение среднего объема эритроцита (MCV). Так, ГГТП определялась не у всех пациентов, но у 36 из 353 (5%) ГГТП превышали в 3 раза верхнюю границу нормы, а у 31 (8,8%) – в 5 раз и более. Значения ГГТП были выше значений АЛТ у большинства пациентов – 263 из 353 (74,5%), отношение ГГТП/АЛТ больше 3 выявлены у 138 пациентов (39,1%). Значения MCV оказались выше 95 фл у 32% пациентов, при этом 12,8% имели выше 100 фл. Таким образом, в соответствии с лабораторными показателями, алкоголь являлся основной или дополнительной причиной цирроза печени примерно у трети пациентов.

Заключение. В настоящее время цирроз печени развивается в основном у лиц трудоспособного возраста (средний возраст пациентов 55 лет). Имеют стойкую утрату трудоспособности 20% мужчин и 15,2% женщин с ЦП.

Среди пациентов с впервые выявленным ЦП класс тяжести А по Чайлд-Пью был установлен только у 25,8%, что свидетельствует о поздней диагностике цирроза у большинства пациентов. Среди всех госпитализированных пациентов больше доля пациентов с циррозом класса А регистрировалась в инфекционном стационаре (42,7%) по сравнению с другими (19,0% в ГОКБ и 34,8% в ГКБ № 3), что может быть связано со скринингом на маркеры вирусных гепатитов, благодаря которому пациенты с вирусными поражениями печени выявляются на ранних стадиях.

Проведенное исследование показало необходимость улучшения этиологической расшифровки циррозов печени, так как в большинстве случаев их этиология остается неуточненной. Выставляются диагнозы «криптогенного», «неуточненного», «невирусного», «токсико-алиментарного», «токсико-метаболического» ЦП, которые не содержат указания на его этиологию и не соответствуют классификации МКБ-10. Недостаточно полно регистрируются и аутоиммунные поражения печени, что, вероятно, связано с отсутствием возможности определения панели аутоантител в стационарах по месту нахождения пациентов.

Алкогольные циррозы, которые в мире являются причиной 30–50% случаев ЦП [3, 5], регистрировались нами только в 3% случаев, хотя, учитывая результаты лабораторных анализов, алкогольный цирроз должен составлять не менее 30%. Для верификации алкогольной этиологии болезней печени следует шире использовать материалы инструкций по применению «Алгоритм клинической диагностики алкогольной болезни печени» (авторы Ю.В. Горгун, Ю.Х. Мараховский и др., 2013) и «Алгоритм выявления алкогольной зависимости у пациентов с хроническими заболеваниями печени» (авторы В.М. Мицура, И.М. Сквиря, 2010).

Обследование на маркеры вирусных гепатитов также нуждается в улучшении. Так, данные исследования выполняются централизованно в ГОИКБ, и в гастроэнтерологические отделения результаты обследования поступают с запозданием, часто после выписки пациента из стационара. Предпочтительно обследовать пациента на маркеры вирусных гепатитов по месту их выявления, в том числе с помощью методов экспресс-диагностики.

Необходимо более тесное взаимодействие инфекционистов и гастроэнтерологов при оказании помощи пациентам с циррозом печени и строгое следование клиническому протоколу «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения» 2017 г.

Литература

1. Радченко, В.Г. Основы клинической гепатологии. Заболевания печени и билиарной системы / В.Г. Радченко, А.В. Шабров, Е.Н. Зиновьева. – СПб.: «Издательство «Диалект»; М.: «Издательство «БИНОМ», 2005. – 864 с.

2. Цирроз печени: учеб.-метод. пособие / Е.Г. Малаева [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2014. – 44 с.

3. Шерлок, Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей / Ш. Шерлок, Дж. Дули; пер. с англ. – М.: Гэотар Медицина, 1999. – 864 с.

4. Zoubek, M.E. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality/ M.E. Zoubek, C. Trautwein, P. Strnad // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2017. – Vol. 31, No. 2. – P. 129-141.

5. Hepatology. A clinical textbook [Electronic resource] / Stefan Mauss [et al.]. – Duesseldorf: Flying Publisher, 2009. – 201 p. – Mode of access: www.HepatologyTextbook.com. – Date of access: 16.09.2019.

STRUCTURE OF HOSPITAL PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS IN GOMEL REGION, 2018

Savarina V.A., Mitsura V.M., Malaeva E.G., Tereshkov D.V., Poddubny A.A.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

The structure of hospitalized patients in Gomel in 2018 with liver cirrhosis was studied according to the following criteria: etiology, gender, age, Child-Pugh predictive class, frequency of repeated hospitalizations, length of hospital stay, disease activity, and laboratory parameters.

Keywords: cirrhosis, etiology, structure, Gomel region, Belarus.

Поступила 16.09.2019

КОРЬ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2018 г.

¹Самойлович Е.О., ¹Семейко Г.В., ²Высоцкая В.С., ¹Ермолович М.А.,
¹Свирчевская Е.Ю., ²Глинская И.Н.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Минск, Республика Беларусь

Резюме. В 2018 г. в Республике Беларусь было выявлено 264 случая кори, из которых 259 выявлены у жителей Республики Беларусь и включены в национальную регистрацию. Среди 259 зарегистрированных случаев кори 225 подтверждены лабораторно с использованием серологических и/или молекулярных методов; 34 случая были эпидемиологически связанными с другим лабораторно подтвержденным случаем кори. Выполнено секвенирование вируса кори от 31 пациента (20 – D8, Gir Somnath, 2 – D8, Cambridge, 9 – B3, Dublin). На основании результатов тщательного эпидемиологического расследования и генотипирования вирусов установлено, что на протяжении февраля-декабря 2018 г. произошло не менее 40 случаев завоза вируса кори на территорию страны. В подавляющем большинстве случаев вирусы кори завозились гражданами Республики Беларусь, выезжавшими в Украину или другие страны через аэропорт Борисполь (Украина), либо гражданами Украины, прибывшими в Республику Беларусь. Выявлено 17 цепочек передачи вируса кори на территории Республики Беларусь. Циркуляция каждого из выявленных генетических вариантов вируса продолжалась не более 2-3 месяцев после чего прекращалась, что подтверждает отсутствие эндемичной циркуляции вируса кори на территории Республики Беларусь в 2018 г.

Ключевые слова: корь, вирус кори, генотипирование, элиминация, Беларусь.

Введение. Несмотря на поставленную цель элиминации кори и краснухи в Европейском регионе, в последние годы ситуация по кори является неблагоприятной. В 2018 г. было зарегистрировано более 80 000 случаев кори, что в 4 раза выше в сравнении с 2017 г. и в 15 раз выше в сравнении с 2016 г. [1]. Сложившаяся ситуация отразилась и на Республике Беларусь, где в 2018 г. также отмечался рост заболеваемости корью.

Целью настоящего исследования явился анализ ситуации по кори в Республике Беларусь в 2018 г., основанный на эпидемиологических данных и результатах генотипирования вируса.

Материалы и методы. Выявление подозрительных на корь пациентов и направление клинического материала на лабораторное исследование проводилось в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кори и краснухи» от 26.12.2013 № 130. Лабораторное обследование всех подозрительных пациентов было выполнено в Республиканской референс-лаборатории по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ основным методом исследования было выявление IgM антител к вирусам кори в ИФА [2]. В отдельных случаях (при сомнительном результате исследования IgM антител, при наличии клинической картины инфекции у ранее вакцинированного пациента) проводилось выявление нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках и обнаружение РНК вируса в клиническом материале в ОТ-ПЦР [3]. Кроме того, выявление РНК вируса в ПЦР с последую-

шим генотипированием вируса проводили для всех тех случаев, которые не имели четкой эпидемиологической связи с другим лабораторно подтвержденным случаем.

Антитела классов IgM и IgG к вирусам кори определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства Siemens, Германия.

Выделение вирусной РНК из клинического материала выполняли с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия).

В целях генотипирования выполняли секвенирование С-терминальной области N-гена (450 нуклеотидов) вируса кори [3]. Амплифицированные фрагменты кДНК вируса кори вырезали из геля, очищали с использованием набора «QIAEX II Gel Extraction Kit» (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit» (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе модели 3500 (Applied Biosystems, США).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения SeqScape v.3.0 (Applied Biosystems, США), выравнивание – с помощью алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6 [4]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

Результаты и обсуждение. В течение 2018 г. в Республике Беларусь было лабораторно обследовано на корь 667 пациентов с экзантемой, выявленных в различных регионах Республики Беларусь, и лабораторно подтверждено 236 случаев кори (таблица). В соответствии с рекомендациями ВОЗ, показатель исключенных случаев (т.е. случаев, для которых на основании результатов лабораторных исследований диагноз корь был отвергнут) должен составлять не менее 2 на 100 000 населения в целом по стране и этот показатель должен быть достигнут на территории 80% и более регионов страны [5]. Как следует из представленных данных (таблица), показатель исключенных случаев кори в Республике Беларусь в 2018 г. составил 4,5 на 100 000 населения. Рекомендованный ВОЗ показатель (не менее 2 на 100 000) был достигнут в каждом из 7 регионов страны, что подтверждает соответствие эпидемиологического надзора за корью в стране международным стандартам.

Таблица. – Результаты лабораторных исследований на корь по регионам Республики Беларусь, 2018 г.

<i>Регион</i>	<i>Число обследованных пациентов</i>	<i>Число выявленных случаев кори</i>	<i>Число исключенных случаев</i>	<i>Показатель исключенных случаев (на 100 000 населения)</i>
Брестская область	76	11	65	4,7
Витебская область	43	14	29	2,4
Гомельская область	210	120	90	6,4
Гродненская область	84	47	37	3,6
г. Минск	58	17	41	2,1
Минская область	97	19	78	5,5
Могилевская область	99	8	91	8,6
Республика Беларусь	667	236	431	4,5

Среди 236 заболевших у 234 диагноз корь был подтвержден обнаружением IgM антител. Два пациента не были обследованы серологически, в их клиническом

материале была выявлена РНК вируса кори. Таким образом, число случаев с подтвержденным диагнозом корь составило 236. Из них у 75 пациентов диагноз корь был подтвержден и серологическими и молекулярными методами. Среди лиц с подтвержденным диагнозом корь 231 составили граждане Республики Беларусь, и 5 – граждане Украины, временно пребывающие в Республике Беларусь.

Важным критерием выполнения программы элиминации кори является показатель лабораторных исследований, т.е. доля лабораторно подтвержденных случаев среди зарегистрированных [5]. По результатам эпидемиологического надзора за корью в 2018 г. лабораторно-подтвержденными являлись 225 (86,9%) из зарегистрированных 259 случаев (5 случаев из 236 подтвержденных на основании результатов лабораторных исследований в 2018 г. были выявлены у граждан Украины, 6 случаев лабораторно подтверждены в конце декабря 2018 г. и включены в официальную регистрацию за январь 2019 г.). Остальные 34 случая являлись эпидемиологически связанными с другим лабораторно подтвержденным случаем кори и, следовательно, не требовали обязательного лабораторного подтверждения. Случаев кори, в которых диагноз был бы установлен только на основании клинических симптомов без лабораторного обследования и без доказательства эпидемиологической связи (так называемых клинически совместимых случаев кори), зарегистрировано не было.

Как известно, критически важное значение для процесса верификации элиминации кори имеет мониторинг цепочек передачи вируса и способность страны различать эндемичные случаи и случаи, связанные с завозом вируса [5]. В соответствии с разработанными ВОЗ индикаторными показателями оценки качества надзора за корью на этапе элиминации ставится задача генотипирования вируса от 80% и более цепочек его передачи. Для выполнения этой задачи в Республике Беларусь было проведено тщательное эпидемиологическое расследование каждого выявленного случая кори. На основании имеющихся эпидемиологических данных проводился анализ первоочередной целесообразности молекулярно-генетических исследований вируса. При проведении молекулярно-генетических исследований основное внимание уделялось определению генотипа по крайней мере для одного изолята от каждой цепочки его передачи, а также генотипированию случаев новых завозов вируса кори на территорию страны, и случаев неизвестного происхождения (из страны не выезжал, эпидемиологическая связь с другим случаем кори не выявлена).

На основании результатов тщательного эпидемиологического расследования каждого выявленного случая кори и было установлено, что на протяжении февраля-декабря 2018 г. имели место не менее 40 эпизодов завоза вируса кори на территорию Республики Беларусь. В основном это были завозы вируса гражданами Республики Беларусь, выезжавшими в Украину или другие страны через аэропорт Борисполь (Украина), либо гражданами Украины, прибывшими в Республику Беларусь. Некоторые завозы вируса привели к его дальнейшему распространению на территории отдельных регионов Республики Беларусь, другие выражались единичными случаями без распространения.

Проведенное секвенирование фрагмента N гена вируса кори от 31 пациента позволило обнаружить вирусы кори, принадлежащие к четырем генетическим вариантам: D8, Gir Somnath (2 варианта: вариант 1 – 19 пациентов, вариант 2 – 1 пациент), D8, Cambridge (2 пациента), B3, Dublin (9 пациентов) (рисунок). Информация о нуклеотидных последовательностях всех выявленных вирусов кори передана в Международную базу данных MeaNS [6].

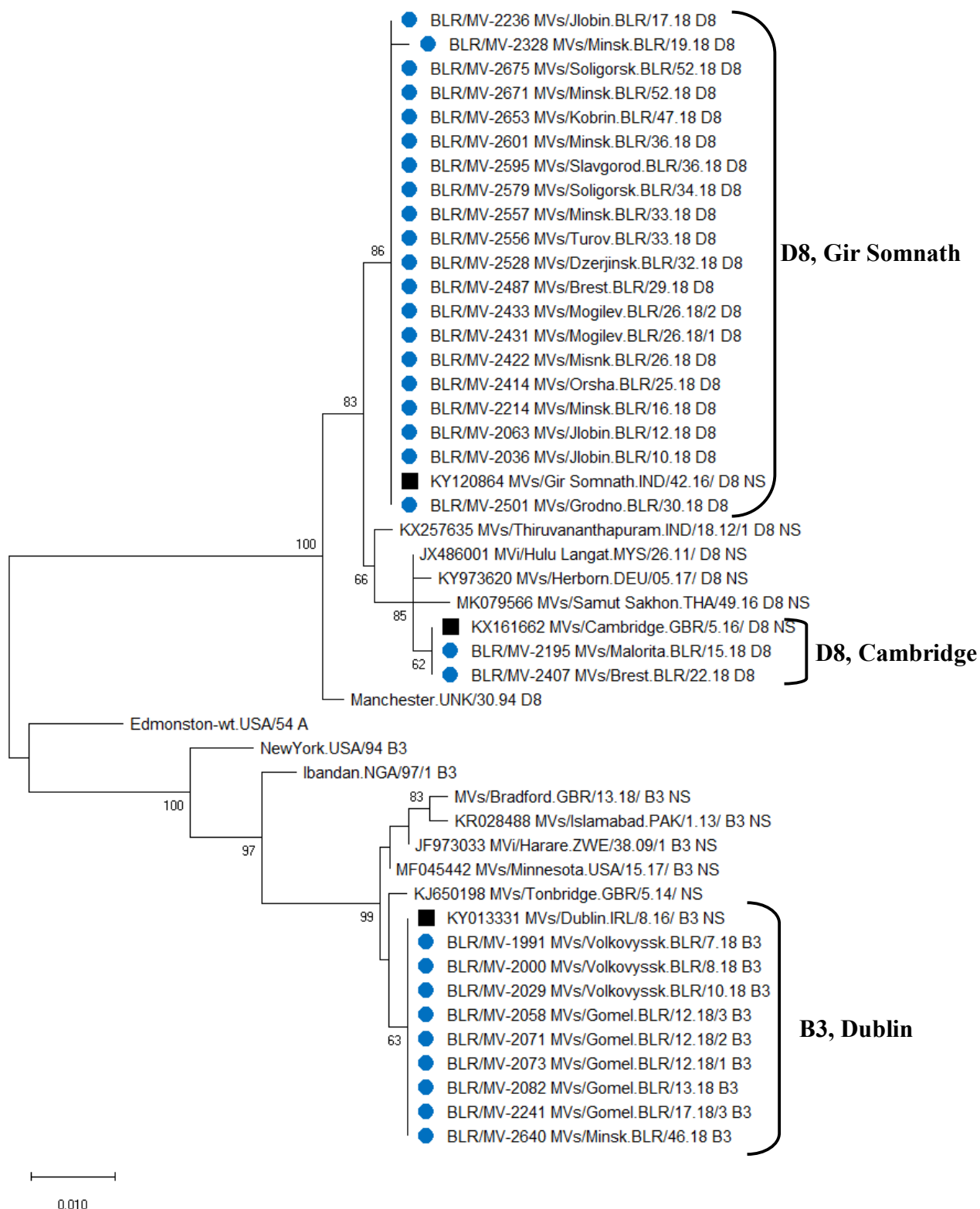


Рисунок. – Дендрограмма, построенная на основании анализа участка N-гена вирусов кори, выявленных в Республике Беларусь в 2018 г. и референс-штаммов (■), с использованием алгоритма максимального подобия

Всего в 2018 г. на территории Республики Беларусь было выявлено 17 цепочек передачи вируса кори. Для каждой из цепочек передачи был установлен генотип виру-

са. Цепочки передачи вируса кори были выявлены во всех регионах Республики Беларусь. В основном они являлись короткими (2-8 случаев), но были выявлены и 5 более длинных цепочек, которые включали от 17 до 76 случаев кори (Гродненская область, Волковысский район, вирус В3, Dublin, 38 случаев, продолжительность между днями начала сыпи у первого и последнего заболевшего – 12.02.2018-16.03.2018; Гомельская область, Жлобинский и Рогачевский районы, вирус D8, Gir Somnath, 76 случаев, продолжительность – 11.03.2018- 02.06.2018; Брестская область, Малоритский район, вирус D8, Cambridge, 25 случаев, продолжительность – 09.04.2018-26.05.2018; Витебская область, г. Орша, вирус D8, Gir Somnath, 17 случаев, продолжительность – 18.06.2018-26.07.2018). Наиболее продолжительной была вспышка, вызванная вирусом D8, Gir Somnath, в Гомельской области (около трех месяцев).

Ежегодные завозы вируса кори на территорию Республики Беларусь имели место и ранее [7], однако с таким, как в 2018 г., количеством завозов ранее сталкиваться не приходилось. Как и в предыдущие годы многие завозы вируса не привели к дальнейшему его распространению, что свидетельствует о существовании хорошей иммунной прослойки в окружении заболевшего. Однако, в отличие от предыдущих лет, когда только в 1-2 случаях происходило ограниченное распространение вируса кори [7, 8], в 2018 г. дальнейшее распространение вируса произошло в 17 случаях. Следует отметить, что цепочки передачи вируса были короткими (2-8 пациентов) и быстро прерывались. И лишь в 5 случаях имела место относительно продолжительная передача вируса, включавшая от 17 до 76 пациентов. Наиболее длительная цепочка передачи вируса кори D8, Gir Somnath имела место в Гомельской области, но и она продолжалась не более 3 месяцев, что позволяет исключить возобновление эндемичной передачи вируса (т.е. наличие цепочек передачи вируса, которая непрерывно продолжается в течение 12 месяцев и более на определенной географической территории, где ранее была достигнута элиминация этой болезни [5]).

В соответствии с критериями выполнения программы элиминации кори [5] доля случаев неустановленного происхождения не должна превышать 20%. В Республике Беларусь в 2018 г. доля таких случаев (из страны не выезжал, с пациентами, подозрительными на корь не контактировал) составила 1,5% (4 из 259). Хотя таких случаев немного, их наличие осложняет интерпретацию полученных результатов, поскольку их причиной может быть нераспознанная циркуляция вируса.

Таким образом, полученные данные подтверждают высокое качество эпидемиологического надзора за корью в Республике Беларусь, позволяющее выявлять и лабораторно обследовать подозрительных на корь пациентов, проводить серологическую и молекулярную диагностику этой инфекции и генотипирование вирусов кори, дифференцировать эндемичные случаи и случаи завоза вируса. Анализ данных 2018 г. с использованием всего арсенала имеющихся методов свидетельствует о том, что рост заболеваемости корью в Республике Беларусь в 2018 г. был связан с многочисленными завозами вируса на территорию страны. В отдельных регионах страны произошло достаточно широкое распространение вируса кори, что представляло угрозу восстановления его эндемичной циркуляции. Однако циркуляция каждого из выявленных генетических вариантов вируса продолжалась не более 2-3 месяцев после чего прекращалась, что в настоящее время позволяет исключить восстановление эндемичной циркуляции. Повторяющиеся завозы вируса одного и того же генотипа осложняют проведение работы по дифференциации эндемичных и завозных случаев кори, требуют усиления мер по надзору за этой инфекцией и разработки новых подходов к молекулярно-генетическому анализу вируса кори.

Литература

1. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region [Electronic resource] // WHO EpiBrief. – 2019. – No. 1. – 9 pp. – Mode of access: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/386707/epibrief2-eng.pdf. – Date of access: 18.09.2019.
2. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, second ed., Geneva: WHO. – 2006. – 100 p.
3. Методы лабораторной диагностики кори и краснухи и генотипирования возбудителей: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 19.12.2018, № 022-1118 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.belriem.by/images/docs/instruction_main/022-1118_16.12.2018.pdf. – Дата доступа: 18.09.2019.
4. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2013. – Vol. 30, No. 12. – P. 2725-2729.
5. WHO Regional Office for Europe. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region, Copenhagen. – 2010. – 48 pp.
6. MeaNS – Measles Nucleotide Surveillance [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.who-measles.org/>. – Date of access: 18.09.2019.
7. Молекулярно-генетические характеристики кори в республике Беларусь / Е.О. Самойлович [и др.] // Молекулярная диагностика – 2018: сб. тр. междунар. науч.-практ. конф., Минск, 27-28 сент. 2018 г. / под ред. акад. РАН В. И. Покровского. – Минск : СтройМедиаПроект, 2018. – С. 150-152.
8. Достижения в элиминации кори и краснухи в Республике Беларусь / Е.О. Самойлович [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – № 4. – С. 94-99.

MEASLES IN REPUBLIC OF BELARUS IN 2018

**Samoilovich E.O., Semeiko G.V., Visotskaya V.S., Yermalovich M.A.,
Svirchevskaya E.Iu., Hlinskaya I.N.**

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

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

In 2018, 264 measles cases were detected in the Republic of Belarus, 259 of them were detected among residents of the Republic of Belarus and included into the national registration. Of the 259 reported measles cases, 225 (86,9%) have been laboratory confirmed using serological and/or molecular methods; 34 cases were epidemiologically related to another laboratory-confirmed measles case. Sequencing of measles virus from 31 patients was performed: 20 strains belonged to genotype D8, Gir Somnath, 2 – D8, Cambridge, 9 – B3, Dublin. Based on the results of a thorough epidemiological investigation and genotyping of viruses, it was found that during February-December 2018 there were at least 40 episodes of the importation of measles virus into the country. In the vast majority of cases, measles viruses were imported by citizens of the Republic of Belarus who traveled to Ukraine or other countries through the airport Borispol (Ukraine), or by citizens of Ukraine who arrived at the Republic of Belarus. 17 chains of transmission of measles virus were detected in the Republic of Belarus. The circulation of each of the identified genetic variants of the virus lasted no more than 2-3 months and then stopped, that confirms the absence of endemic circulation of measles virus in the Republic of Belarus in 2018.

Keywords: measles, measles virus, genotyping, elimination, Belarus.

Поступила 18.09.2019

КРАСНУХА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2016-2019 гг.

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

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Выполненное в 2016-2019 (8 месяцев) гг. лабораторное обследование 1517 подозрительных на краснуху пациентов позволило выявить 3 случая краснухи (1 – в 2017 г., 2 – в 2018 г.). Многолетний показатель заболеваемости составил менее 1 случая на млн. населения. На основании эпидемиологических данных и результатов молекулярно-генетического изучения вирусов все 3 случая краснухи были отнесены к завозным: в 2017 г. – из Индонезии, в 2018 г. – из Индии (2 случая). По результатам секвенирования участка E1 гена, вирус краснухи, импортированный из Индонезии принадлежал к генотипу 1E, из Индии – к генотипу 2B. Представленные данные свидетельствуют об успешном выполнении программы элиминации краснухи в Республике Беларусь.

Ключевые слова: краснуха, вирус краснухи, генотипирование, элиминация, Беларусь.

Введение. Внедрение в Республике Беларусь вакцинации с использованием трехвалентной вакцины корь-паротит-краснуха (с 1996 г. – однодозовая схема вакцинации, с 2000 г. – двухдозовая схема) существенно снизило заболеваемость краснухой, но еще в начале 2000-х годов ежегодно выявлялось несколько тысяч заболевших этой инфекцией. Показатель заболеваемости колебался от 69,09 на 100 000 населения в 2001 г. до 24,39 на 100 000 населения в 2006 г. 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 кардинальным образом отразились на заболеваемости, и, начиная с 2007 г., в Республике Беларусь регистрируются единичные случаи краснухи [1], что свидетельствует об успешном выполнении в стране программы Европейского регионального бюро ВОЗ элиминации кори и краснухи.

Важные доказательства отсутствия эндемичной циркуляции вируса представляют результаты его генотипирования. По результатам секвенирования и филогенетического анализа участка E1 гена вируса краснухи (739 н.о.), рекомендованного для генотипирования, выделяют 13 генотипов этого вируса: 10 генотипов в пределах клейда 1 (1a-1J) и 3 генотипа в пределах клейда 2 (2A-2C) [2].

Целью настоящего исследования явился анализ ситуации по краснухе в Республике Беларусь с использованием эпидемиологических данных и результатов генотипирования вируса.

Материалы и методы. Выявление подозрительных на краснуху пациентов и направление клинического материала на лабораторное исследование проводилось в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кори и краснухи» от 26.12.2013 № 130. Лабораторное обследование выполнялось в Республиканской референс-лаборатории по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). В соответствии с рекомендациями ВОЗ все случаи, соответствующие стандартному определению случая кори и/или случая краснухи, были обследованы на наличие специфических IgM антител к обеим инфекциям [3].

Специфические антитела класса IgM определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства Siemens (Германия), Humans

(Германия), Euroimmune (Германия), Вектор-БЕСТ (Российская Федерация), Диапроф-Мед (Украина).

Вирусную РНК выделяли из клинического материала (носоглоточный мазок, моча) с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Обнаружение РНК вируса краснухи выполняли в ОТ-ПЦР в реальном времени [4].

Генотипирование вируса краснухи проводили на основании анализа нуклеотидной последовательности варибельного участка E1 гена длиной 739 нуклеотидов. Поскольку участок для генотипирования является достаточно длинным, для получения необходимой нуклеотидной последовательности он разделен на два перекрывающихся фрагмента, которые амплифицировали с использованием описанной в инструкции методики [4]. Амплифицированные фрагменты кДНК вируса краснухи вырезали из геля, очищали с использованием набора «QIAEX II Gel Extraction Kit» (QIAGEN, Германия) и секвенировали в обоих направлениях с использованием набора «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit» (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе модели 3500 (Applied Biosystems, США).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения SeqScape v.3.0 (Applied Biosystems, США), выравнивание – с помощью алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 6 [5]. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

Результаты и обсуждение. В течение практически 4 лет наблюдения (2016-2019 гг.) в Республике Беларусь в рамках проведения надзора за корью и краснухой на краснуху обследовано 1 517 пациентов (2016 г. – 399, 2017 г. – 336, 2018 г. – 473, 2019 г. (8 месяцев) – 309), выявлено 3 случая краснухи: 1 – в 2017 г. у жителя г. Минска после возвращения из Индонезии, 2 – в 2018 г. у жителей Индии (студенты), временно пребывающих в Республике Беларусь.

У всех трех заболевших краснухой диагноз подтвержден обнаружением специфических IgM антитела в сыворотке крови и РНК вируса краснухи в носоглоточном соскобе и/или моче.

Секвенирование вируса краснухи выполнено от двух пациентов (два завозных случая из Индии в 2018 г. являлись эпидемиологически связанными, поэтому исследовали вирус от одного из пациентов). Для одного из них (2018 г.) секвенированы рекомендованные 739 н.о. E1 гена, для другого (2017 г.) удалось секвенировать фрагмент – 371 н.о. E1 гена.

Выполненный филогенетический анализ фрагмента E1 гена (317 н.о.) вируса краснухи, импортированного из Индонезии в 2017 г., показал, что вирус принадлежал к генотипу 1E (рисунок 1).

Вирус, импортированный из Индии в 2018 г., принадлежал к генотипу 2B (рисунок 2).

Анализ филогенетических взаимоотношений выявленного в 2018 г. в Беларуси вируса краснухи и вирусов генотипа 2B, идентифицированных в 2017 г. в Великобритании и Израиле, показал, что они кластеризовались совместно, что свидетельствует об общем происхождении. Различия между белорусским вирусом и вирусами из Великобритании и Израиля составляли 1,35% (10 нуклеотидов) и 1,60% (12), соответственно.

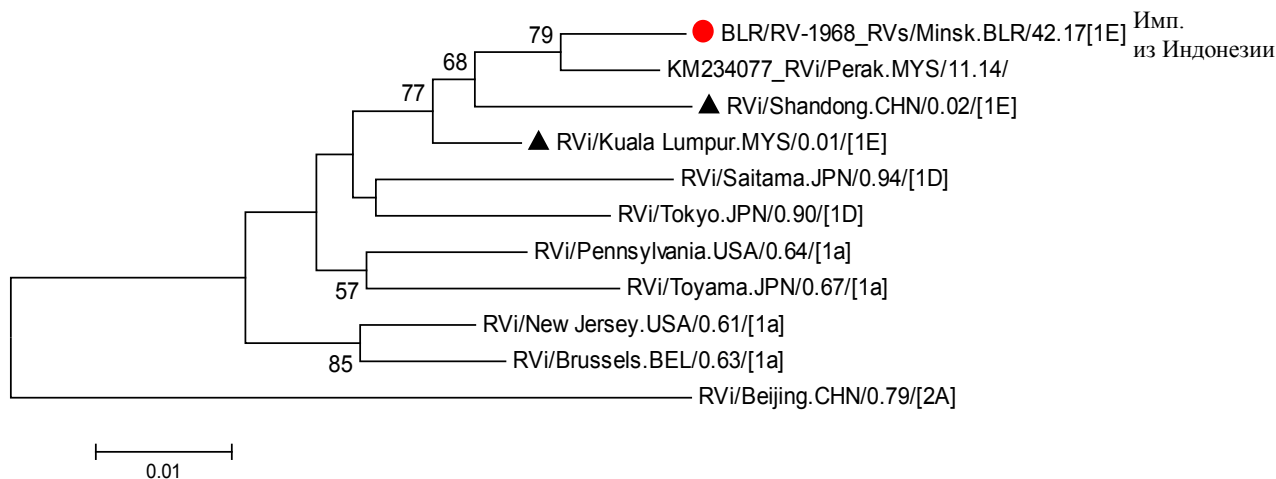


Рисунок 1. – Филогенетический анализ вируса краснухи, импортированного в Республику Беларусь в 2017 г. из Индонезии (371 н.о.)

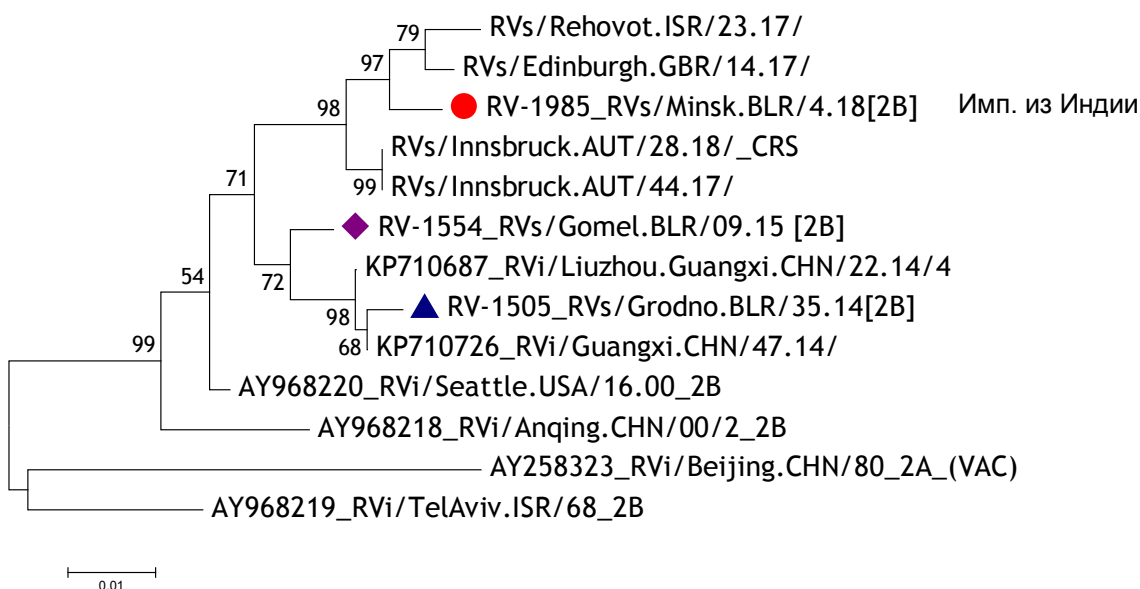


Рисунок 2. – Филогенетический анализ вируса краснухи, импортированного в Республику Беларусь в 2018 г. из Индии (739 н.о.)

Эпидемиологические данные за 2016-2019 гг. и результаты секвенирования вирусов показали, что все выявленные случаи краснухи являлись завозными, не получившими распространения на территории Республики Беларусь. Информация о нуклеотидных последовательностях вирусов краснухи, импортированных в Республику Беларусь, была депонирована в базу данных RubeNS [6].

Анализ данных, представленных в базе данных нуклеотидных последовательностей вируса краснухи ВОЗ (RubeNS) показал, что в 2016 г. в мире циркулировали 5 (1E, 1G, 1H, 1J, 2B) из 13 существующих генотипов, а уже в 2018 г. их разнообразие уменьшилось до 2 (1E и 2B), при этом количество секвенированных и представленных в RubeNS вирусов увеличилось с 2016 г. по 2018 г. в 4,4 [6, 7]. Также значительно изменился пейзаж циркулирующих генотипов: в 2016 г. на долю генотипа 2B приходилось 92% представленных в базе данных вирусов, они выявлялись преимущественно в Китае, Японии, восточной части России и ряде стран Юго-Восточной Азии; к 2018 г. их доля уменьшилась до 12% от общего количества представленных вирусов, однако они стали

повсеместно выявляться в странах Европейского региона. При этом доля генотипа 1E увеличилась с 4% в 2016 г. до 88% в 2018 г., однако он был практически полностью вытеснен из циркуляции в Европе, но стал доминирующим в Японии [6]. Такое уменьшение разнообразия выявляемых генотипов за последние годы свидетельствует об улучшении популяционного иммунитета, это подтверждают и данные заболеваемости (в частности в Европейском регионе ВОЗ в 2018 г. было выявлено 850 случаев краснухи) [8].

Заключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что в последние годы заболеваемость краснухой в Республике Беларусь находится на уровне ≤ 1 случая на миллион населения, что соответствует критерию элиминации инфекции. Результаты молекулярного мониторинга циркуляции вируса краснухи подтверждают, что практически ежегодно вирусы краснухи различных генетических вариантов завозятся на территорию Республики Беларусь, но эндемичная передача этого вируса отсутствует.

Литература

1. Самойлович, Е.О. Надзор за вакциноуправляемыми инфекциями в Республике Беларусь: соответствие международным стандартам / Е.О. Самойлович // *Здравоохранение*. – 2014. – № 6 – С. 7-11.
2. Rubella virus nomenclature update: 2013 // *Wkly. Epidemiol. Rec.* – 2013. – Vol. 88, No. 32. – P. 337-343.
3. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella and congenital rubella syndrome. Third edition, June 2018. [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/manual/en/.
4. Методы лабораторной диагностики кори и краснухи и генотипирования возбудителей: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 19.12.2018, № 022-1118 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.belriem.by/images/docs/instruction_main/022-1118_16.12.2018.pdf. – Дата доступа: 18.09.2019.
5. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. / К. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – Vol. 30. – P. 2725-2729.
6. RubeNS – Rubella Nucleotide Surveillance [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.who-rubella.org/>. – Date of access: 18.09.2019.
7. Genetic characterization of measles and rubella viruses detected through Global measles and rubella elimination surveillance, 2016-2018 / К.Е. Brown [et al.] // *Morb. Mortal. Wkly Rep.* – 2019. – Vol. 68, No. 5. – P. 587-591.
8. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region [Electronic resource] // *WHO EpiBrief.* – 2019. – No. 1. – 9 pp. – Mode of access: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/386707/epibrief2-eng.pdf. – Date of access: 05.06.2019.

RUBELLA IN REPUBLIC OF BELARUS IN 2016-2019

Semeiko G.V., Samoilovich E.O., Yermalovich M.A., Svirchevskaya E.Iu.

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

Laboratory examination of 1517 rubella-suspected patients carries out in 2016-2019 (8 months) revealed 3 cases of rubella (1 - 2017, 2 - in 2018). The multi-year incidence rate was less than 1 case per million of population. Based on epidemiological data and the results of molecular genetic study of viruses, all 3 cases of rubella were classified as imported: in 2017 - from Indonesia, in 2018 - from India (2 cases). According to the results of sequence analysis of part of E1 gene, rubella virus imported from Indonesia belonged to genotype 1E, from India – to genotype 2B. The data presented shows the successful implementation of the rubella elimination program in the Republic of Belarus.

Keywords: rubella, rubella virus, genotyping, elimination.

Поступила 18.09.2019

КИШЕЧНЫЕ ПАРАЗИТАРНЫЕ ИНВАЗИИ В УКРАИНЕ

¹Шагинян В.Р., ¹Данько О.П., ¹Сопиль А.В., ¹Дьяченко О.П.,
²Николаенко С.Н.

¹Государственное учреждение «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины», Киев, Украина

²Государственное учреждение «Центр общественного здоровья Министерства здравоохранения Украины», Киев, Украина

Резюме. В работе представлены результаты ретроспективного (2009-2018 гг.) анализа инвазированности населения Украины кишечными паразитами (данные отчетности Министерства здравоохранения Украины). На примере наиболее распространенных гельминтов показано снижение частоты их выявления. Установлена тенденция к росту распространенности *Blastocystis spp.* Собственными исследованиями (1995-2016 гг.) установлено возрастание инвазированности простейшими. Исследования 2018-2019 гг. показали высокую инвазированность лиц с дисфункцией ЖКТ и ВИЧ-инфицированных пациентов (30,6% и 28,0% соответственно). Инвазия, вызванная *Cryptosporidium spp.*, у ВИЧ-инфицированных лиц отмечалась чаще (10,5% и 0,6%), а *Blastocystis spp.* – реже (15,5% и 27,2%, $p < 0,005$), чем у пациентов с дисфункцией ЖКТ.

Ключевые слова: кишечные паразитарные инвазии, распространенность, Украина.

Введение. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в борьбе с паразитарными болезнями, они до сих пор остаются актуальной проблемой здравоохранения во многих странах мира. Наиболее распространенными кишечными паразитами являются аскаридоз (примерно 1,2 млрд. инвазированных), трихоцефалез (около 800 млн. инвазированных) и анкилостомоз (около 800 млн. инвазированных) [1]. Проблема паразитарных инвазий обусловлена не только их широкой распространенностью, но и сенсibiliзирующим и иммунодепрессивным влиянием ряда кишечных паразитов, возникновением в организме хозяина широкого спектра патогенетических реакций [2]. К сожалению, оценить истинную распространенность кишечных паразитарных инвазий в мире затруднительно. Так, в компьютеризованной системе информации по инфекционным болезням Европейского регионального бюро ВОЗ (CISID) [3] отсутствуют данные о выявлении достаточно распространенных гельминтозов (аскаридоз, трихоцефалез, энтеробиоз), ряда оппортунистических кишечных простейших. Последние данные доступны лишь за 2012 год по нескольким странам. В последние годы активно изучается роль кишечных паразитов в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Наибольший интерес вызывают оппортунистические простейшие, в первую очередь *Blastocystis spp.* [4-6]. Несмотря на неоднозначность ответа на вопрос о патогенности оппортунистических простейших, их выявление, безусловно, имеет большое значение. Для оценки значимости паразитарных инвазий важно оценить динамику распространенности кишечных паразитов, в том числе патогенных и условно патогенных простейших в различных группах населения.

Цель работы: изучить распространенность кишечных паразитарных инвазий и ее динамику по данным статистических форм Министерства здравоохранения (МЗ) и результатам исследований, проведенных в ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины» (Институт).

Материалы и методы. Проведен анализ данных официальной статистической отчетности МЗ Украины (отраслевая статистическая отчетная форма Ф № 40-здоров «Звіт про роботу санітарно-епідеміологічної (дезінфекційної, протичумної) станції»),

раздел Паразитология) за период 2009-2018 гг. и результатов паразитологических исследований, проведенных в Институте на протяжении 1995-2016 гг. Проведено паразитологическое обследование 373 мужчин и женщин в возрасте 18-60 лет. Из числа обследованных 173 составили пациенты с жалобами на дисфункцию желудочно-кишечного тракта и 200 – ВИЧ-позитивные пациенты. Для выявления энтеропаразитов фекалии пациенты собирали во флаконы з консервантом [7]. Концентрацию фекалий проводили флотационным методом по Фюлеборну. Для выявления кишечных простейших готовили нативные и окрашенные раствором Люголя мазки. Для выявления ооцист *Cryptosporidium spp.* использовали метод окрашивания мазков по Циль-Нильсену. Исследования проводили под бинокулярным микроскопом при увеличении 10x10-10x100. Статистическую обработку результатов и расчеты проводили с помощью унифицированных функций, предусмотренных программой Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение. При анализе данных официальной отчетности МЗ за последние 10 лет (2009-2018 гг.) установлено, что показатели инвазированности населения Украины кишечными паразитами в целом снижались на протяжении всего периода наблюдения. Наиболее высокой была инвазированность *Enterobius vermicularis* и *Ascaris lumbricoides*, поэтому динамика инвазированности гельминтами продемонстрирована на примере наиболее распространенных кишечных паразитозов – энтеробиоза и аскаридоза (рисунок 1).

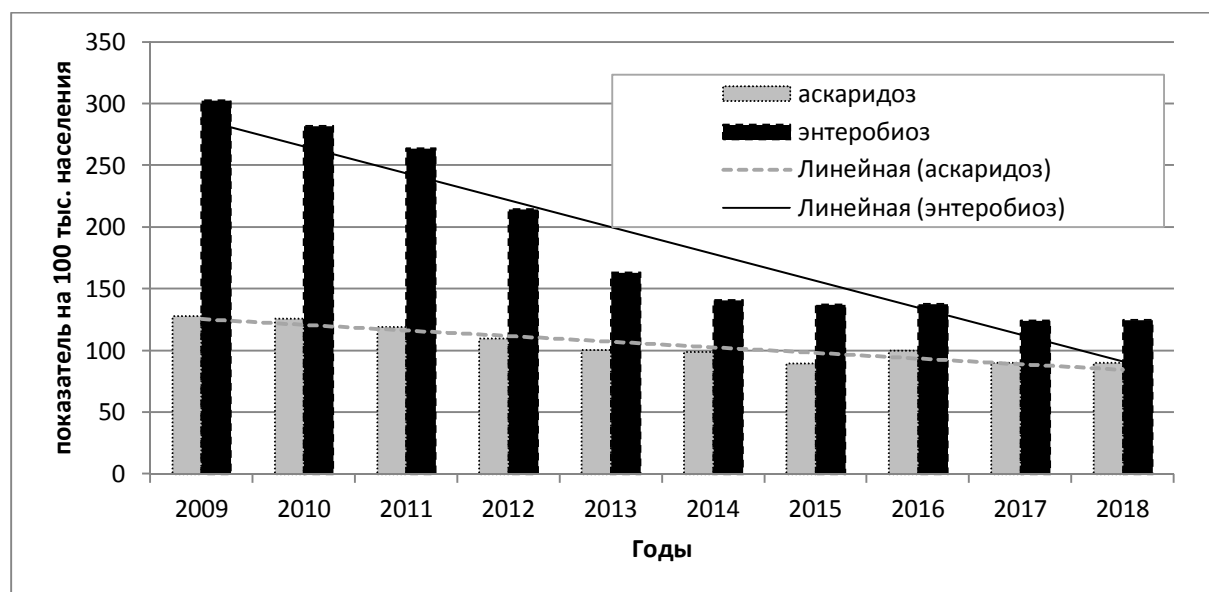


Рисунок 1. – Динамика инвазированности *Enterobius vermicularis* и *Ascaris lumbricoides* населения Украины (2009-2018 гг.)

В отношении наиболее актуальных кишечных простейших можно отметить снижение показателей инвазированности *Giardia lamblia* с 71,28 на 100 тыс. населения в 2009 г. до 26,22 – в 2018 г., стабильно невысокие показатели выявления *Cryptosporidium spp.* (в пределах 0,1-0,2 на 100 тис. населения) и тенденцию к повышению инвазированности *Blastocystis spp.* (рисунок 2).

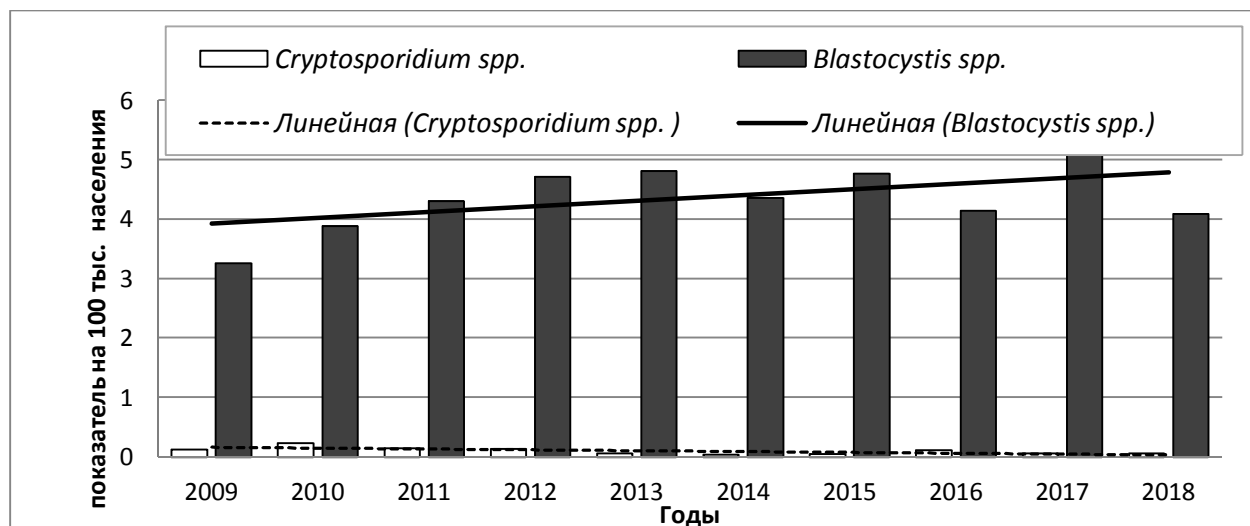


Рисунок 2. – Динамика инвазированности *Cryptosporidium spp.* и *Blastocystis spp.* населения Украины (2009-2018 гг.)

По данным официальной отчетности МЗ Украины, на протяжении анализируемого периода процент инвазированных кишечными паразитами среди обследованных детей был выше, чем среди взрослых. В качестве примера, на рисунке 3 представлены данные по инвазированности гельминтами и кишечными простейшими детей и взрослых в 2014-2016 гг.

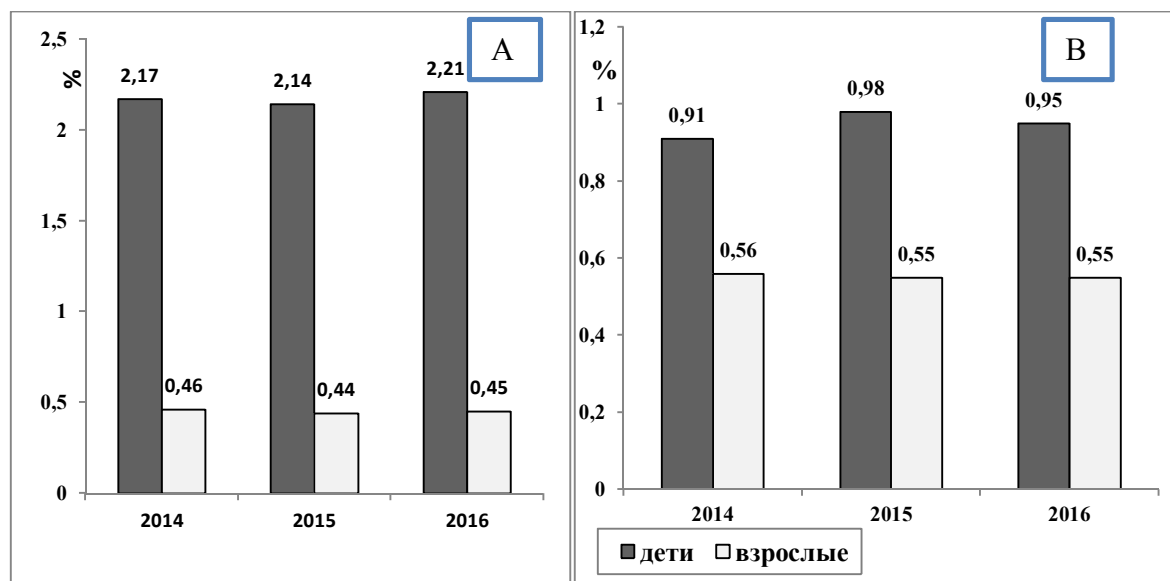


Рисунок 3. – Инвазированность гельминтами (А) и кишечными простейшими (В) детей и взрослых (по данным МЗ Украины)

Из рисунка видно, что наиболее заметной была разница в инвазированности детей гельминтами – приблизительно в 5 раз выше, чем взрослых. Доминирующими кишечными простейшими у детей были *Giardia lamblia* и *Blastocystis spp.*, у взрослых – *Cryptosporidium spp.* и *Entamoeba histolytica*.

Анализ результатов паразитологических обследований, проведенных в Институте на протяжении 1995-2016 гг., свидетельствует о постепенном возрастании уровня инвазированности как детей (с 7,4% до 21,7%), так и взрослых (с 13,8% до 26,1%). Во все периоды наблюдения более пораженными оказались взрослые (рисунок 4), инвазированность которых кишечными паразитами превышала инвазированность детей

в 1,9; 1,5 и 1,2 раза соответственно. В то же время, можно отметить нивелирование разницы в показателях инвазированности детей и взрослых. В данном случае термин инвазированность соответствует значению распространенность, поскольку учитывались все случаи кишечных инвазий, в том числе оппортунистических, без количественного определения простейших, что имеет значение для клинического диагноза.

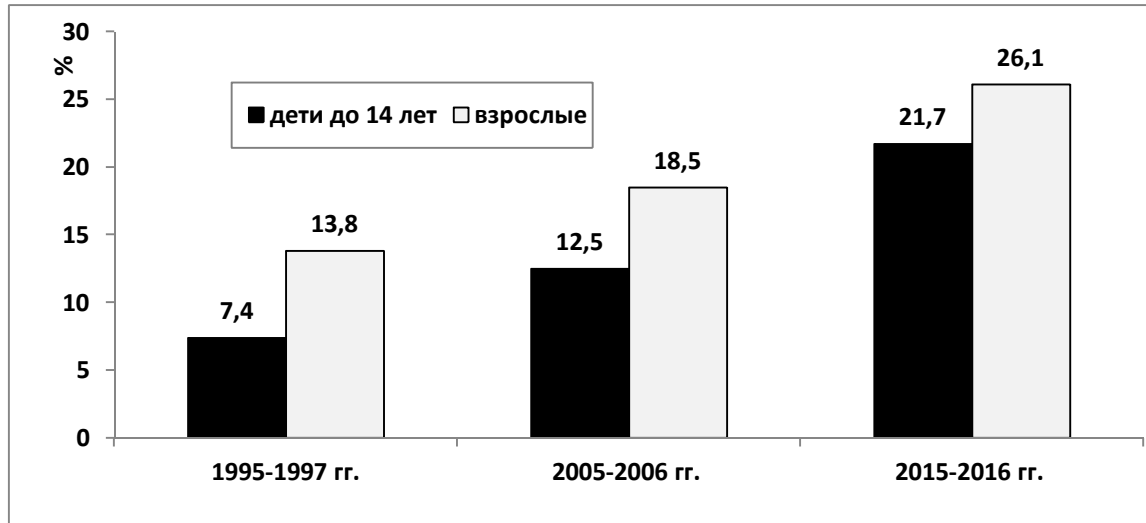


Рисунок 4. – Инвазированность кишечными паразитами детей и взрослых в разные периоды (по данным исследований, проведенных в Институте)

На протяжении всех анализируемых периодов, у обследованных чаще выявляли кишечных простейших, чем гельминты. В 2015-2016 гг. у детей гельминты выявлены не были вообще, а у обследованных взрослых инвазированных простейшими было в 8 раз больше, чем гельминтами. Среди кишечных простейших чаще выявляли *Blastocystis spp.*, *Giardia lamblia* и *Entamoeba histolytica*. При этом показатели выявления *Blastocystis spp.* выросли почти в 3 раза (с 6,5% до 19,5%), а *Giardia lamblia* – снизились в 10 раз (с 4,1% до 0,4%). Частота выявления цист *Entamoeba histolytica* оставалась практически на одном уровне. Таким образом, сопоставление результатов собственных исследований с данными статистики МЗ Украины свидетельствует о совпадении доминирующих форм кишечных простейших. В то же время следует отметить несовпадения в показателях инвазированности гельминтами и более высокую распространенность кишечных простейших у пациентов, обследованных в Институте. Это может быть обусловлено различиями в обследованных контингентах. В клинику Института чаще обращаются пациенты уже обследованные в лабораториях практического здравоохранения. Пациенты с выявленными гельминтами проходят дегельминтизацию и, как правило, не обращаются другие лаборатории. Контингент наших пациентов – преимущественно люди с дисфункцией ЖКТ неустановленной этиологии, что может объяснить высокие показатели выявления у них кишечных простейших, в том числе оппортунистических.

Тенденцией последних лет является возрастание распространенности оппортунистических кишечных простейших. Паразитарная инвазия, вызванная *Cryptosporidium spp.*, считается наиболее распространенной среди ВИЧ-инфицированных пациентов [8, 9]. В то же время, по мнению ряда авторов *Blastocystis spp.* принадлежит важная роль в развитии некоторых соматических заболеваний ЖКТ, в первую очередь синдрома раздраженного кишечника [4-6], при этом значение оппортунистических простейших возрастает у лиц с нарушениями в иммунной системе. С целью выяснения роли различных оппортунистических простейших в патологии ЖКТ, в том числе при наличии иммунодефицита, нами в 2018-2019 гг. было проведено

паразитологическое обследование 173 пациентов с жалобами на дисфункцию ЖКТ и 200 ВИЧ-позитивных лиц. Результаты представлены в таблице.

Таблица. – Результаты обследования на наличие кишечных паразитов некоторых групп взрослого населения

Кишечные паразиты	Обследованные контингенты			
	Пациенты с дисфункцией ЖКТ (173)		ВИЧ-позитивные пациенты (200)	
	Выявлено инвазированных		Выявлено инвазированных	
	Абс. число	%±m	Абс. число	%±m
Гельминты	4	2,3±1,13	3	1,5±0,86
<i>Giardia lamblia</i>	1	0,6±0,6	1	0,5±0,5
<i>Cryptosporidium spp.</i>	1	0,6±0,6	21	10,5±2,2
<i>Blastocystis spp.</i>	47	27,2±3,4	31	15,5±2,6
Всего инвазированных	53	30,6±3,5	56	28,0±3,2

Инвазированность кишечными паразитами оказалась высокой в обеих группах, показатели статистически не различались (30,6% и 28,0%). При этом глистные инвазии чаще обнаруживали у пациентов с дисфункцией ЖКТ ($p>0,05$). Спектр гельминтов, выявленных в этой группе был более широким, чем у ВИЧ-позитивных пациентов, у которых были выявлены только *Ascaris lumbricoides*. Наиболее распространенной инвазией был бластоцистоз (27,2% и 15,5%), при этом частота выявления *Blastocystis spp.* у ВИЧ-инфицированных пациентов была достоверно ниже ($p<0,005$), чем у взрослых с дисфункцией ЖКТ. Другой оппортунистический паразитоз – криптопоридиоз, напротив, встречался у ВИЧ-инфицированных пациентов в 10 раз чаще, что совпадает с данными литературы. Вопрос о том, почему оппортунистические простейшие – *Blastocystis spp.* у лиц с иммунодефицитом встречались реже, чем в аналогичной группе взрослых, но без иммунодефицита требует дополнительных исследований. Учитывая результаты, полученные в работе [10], можно предположить, что наличие *Blastocystis spp.* у ВИЧ-позитивных лиц можно расценивать как благоприятный фактор, свидетельствующий о позитивной иммунологической динамике, отмечающейся у некоторых пациентов.

Выводы.

1. Изучение динамики распространенности паразитарных кишечных инвазий за 10 лет (2009-2018 гг.), на основании данных отчетов МЗ Украины, свидетельствует о снижении инвазированности населения гельминтами и тенденции к возрастанию выявления кишечных простейших, в частности *Blastocystis spp.*

2. Показатели инвазированности зависят от обследуемых контингентов, что необходимо учитывать при проведении эпиднадзора за кишечными паразитогами. Среди лиц, обследованных преимущественно с профилактической целью (данные МЗ Украины), среди инвазированных преобладали дети, у которых были выявлены гельминты. Среди лиц, обследованных по клиническим показаниям (пациенты Института), паразитарные инвазии выявляются чаще у взрослых, преобладают инвазии, вызванные оппортунистическими простейшими (*Blastocystis spp.*).

3. По данным собственных исследований, распространенность кишечных паразитов у пациентов с дисфункцией ЖКТ и ВИЧ-инфицированных пациентов статистически не различалась (30,6% и 28,0%), при этом инвазия, вызванная *Cryptosporidium spp.*, у ВИЧ-инфицированных отмечалась чаще (10,5% и 0,6% соответственно), а *Blastocystis spp.* – реже (15,5% и 27,2%, $p<0,005$), чем у пациентов с дисфункцией ЖКТ.

Литература

1. Controlling soil-transmitted helminthiasis in PreSchoolAge children through preventive chemotherapy / M. Albonico [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2008. – Vol. 2. – P. 126-135.
2. Кочергина, Е.А. Особенности лечения паразитарных заболеваний / Е.А. Кочергина, И.П. Корюкина, Е.В. Зубов // РМЖ. – 2004. – № 13. – С. 815-823.
3. CISID – Centralized Information System for Infectious Diseases [Electronic resource] / World Health Organization. Regional Office for Europe. – Mode of access: <http://data.euro.who.int/cisid/Default.aspx>. – Date of access: 27.08.2019.
4. Parasitosis and irritable bowel syndrome / C. Ibarra [et al.] // Rev. Chilena Infectol. – 2016. – Vol. 33, No. 3. – P. 268-274.
5. Irritable bowel syndrome and intestinal parasites: a view from South America / G. Vasquez-Rios [et al.] // Rev. Gastroenterol Peru. – 2016. – Vol. 36, No. 2. – P. 153-158.
6. The role of *Blastocystis sp.* and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis / A. Rostami [et al.] // Parasitol. Res. – 2017. – Vol. 116, No. 9. – P. 2361-2371.
7. Склад для обробки проб досліджуваного матеріалу при проведенні досліджень біологічних матеріалів: пат. UA 114976 / О.П. Данько, В.Р. Шагінян, Г.В. Сопіль. – Опубл. 28.08.2017.
8. Shimelis, T. Cryptosporidium and other intestinal parasitic infections among HIV patients in southern Ethiopia: significance of improved HIV-related care / T. Shimelis, Ya. Tassachew, T. Lambiyo // Parasit. Vectors. – 2016. – Vol. 9, No. 1. – P. 270-277.
9. Prevalence of Cryptosporidium, microsporidia and Isospora infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis / Z.D. Wang [et al.] // Parasit. Vectors. – 2018. – Vol. 11, No. 1. – P. 28. doi: 10.1186/s13071-017-2558-x.
10. HIV and intestinal parasite co-infections among a Chinese population: an immunological profile of poverty / T. Li-Guang [et al.] // Infect. Dis. Poverty. – 2013. – Vol. 2. – P. 18. doi: 10.1186/2049-9957-2-18.

INTESTINAL PARASITIC INFESTATIONS IN UKRAINE

¹Shahinian V.R., ¹Danko O.P., ¹Sopil H.V., ¹Dyachenko O.P., ²Nikolaenko S.M.

¹The Lev Gromashevsky Institute of Epidemiology & Infectious Disease NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Public Health Center of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The paper presents the results of retrospective (2009-2018) analysis of infestation of the population of Ukraine with intestinal parasites (reporting data of the Ministry of health of Ukraine). On the example of the most common helminthes shows a decrease in the frequency of their detection. The tendency to increase the prevalence of *Blastocystis spp* is established. Own research (1995-2016), was established the increase of infestations of protozoa. Studies 2018-2019 showed a high prevalence intestinal parasites in persons with gastrointestinal dysfunction and HIV-infected patients (30.6% and 28.0%, respectively). Invasion caused by *Cryptosporidium spp.*, in HIV-infected individuals were more frequent (10.5% and 0.6%), and *Blastocystis spp.* - less frequently (15.5% and 27.2%, $p < 0.005$) than in patients with gastrointestinal dysfunction.

Keywords: intestinal parasitic infestations, prevalence, Ukraine.

Поступила 27.08.2019

Оригинальные исследования

ОДНОВРЕМЕННАЯ БЫСТРАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ НА НЕРЕСПИРАТОРНЫХ ОБРАЗЦАХ И ТКАНЕВОМ МАТЕРИАЛЕ

¹Дюсьмикеева М.И., ¹Скрягина Е.М., ¹Яцкевич Н.В.,
²Журкин Д.М., ²Михайлова О.В.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Комплексный метод диагностики мультирезистентного туберкулеза с использованием молекулярно-генетических исследований позволяет значительно ускорить диагностику и назначение адекватного лечения, сократить сроки бактериовыделения и пребывания пациентов в стационаре, что, в целом, будет способствовать повышению эффективности лечения, минимизации дальнейшей трансмиссии мультирезистентного туберкулеза, и снижению экономических затрат, связанных с лечением.

Метод обладает экономической эффективностью за счет снижения сроков лечения пациентов с туберкулезом, так как позволяет обеспечить своевременное адекватное лечение этих пациентов в соответствии с быстро установленным спектром лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (снижение финансовых затрат на 20-25%).

Ключевые слова: мультирезистентный туберкулез, молекулярно-генетические исследования, диагностика, эффективность лечения.

Введение. Актуальность исследования по разработке метода диагностики мультирезистентного туберкулеза с использованием молекулярно-генетических исследований обусловлена значительной распространенностью, социальной и экономической значимостью туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, необходимостью внедрения в практику отечественного здравоохранения новых высокотехнологичных молекулярно-генетических методов диагностики и отсутствием в республике единой методологии лабораторной диагностики туберкулеза на основе современных молекулярных исследований [1, 2]. Существующие классические методы диагностики ТБ, основанные на прямом или косвенном выявлении возбудителя туберкулеза, такие как бактериоскопический, культуральный, иммуноферментный, цитологический, гистологический, весьма эффективны, но отличаются или недостаточной чувствительностью, или длительностью выявления МБТ [3, 4]. Молекулярно-генетический метод Xpert MTB/RIF является эффективным и быстрым методом диагностики легочного и внелегочного туберкулеза, который позволяет быстро, за 2 часа, не только выявить ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) в биологическом материале (нереспираторном и резекционном), но и установить наличие лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину [5, 6].

Цель работы: оценить эффективность применения разработанного алгоритма одновременной быстрой диагностики туберкулеза и лекарственной устойчивости возбудителя на нереспираторных образцах и тканевом материале.

Материалы и методы исследования. Проведено обследование 159 пациентов (в возрасте 40,9±6,8 лет, 119 мужчин, 40 женщин) с клинически установленным диагнозом множественно лекарственно-устойчивого туберкулеза легких (МЛУ-ТБ). Были выявлены такие клинические формы туберкулеза, как инфильтративный туберкулез легких - 82,4%, подострый диссеминированный туберкулез - 8,8%, очаговый туберкулез легких - 5,7%, туберкулема легких - 1,9%, милиарный туберкулез легких - 0,6%, казеозная пневмония – 0,6%. При проведении рентгенологического исследования органов грудной клетки распад легочной ткани был выявлен у 60 (37,7%) пациентов. Впервые выявленных пациентов было 120, ранее леченных – 19, после первого неэффективного лечения – 6, после повторного неэффективного лечения - 6, после перерыва в лечении – 4, с другими причинами, не получавших этиотропного лечения, было 4. Пациентов с ВИЧ-отрицательным статусом было 139, ВИЧ-положительных – 16, у 4-х пациентов данные о ВИЧ-статусе отсутствовали.

С целью оценки эффективности в отношении сокращения сроков установления диагноза МЛУ-ТБ, своевременности, длительности и результатов лечения при различных методах выявления микобактерий туберкулеза (МБТ) и чувствительности МБТ к противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТЛС) проведен ретроспективный анализ историй болезни и карт лечения двух групп сравнения.

Первую группу сравнения составили 30 пациентов, которым выполнялись исследования биологического материала с использованием автоматизированной бактериологической системы Bactec MGIT 960 и традиционные бактериологические методы. Вторая группа сравнения состояла из 22 человек, которым выполнялись только традиционные бактериологические методы исследования биологического материала. Основная группа и группы сравнения были сопоставимы по клиническим формам туберкулеза, а также по полу и возрасту.

При проведении оценки эффективности различных методов выявления МЛУ-ТБ изучалась длительность проведения, результативность традиционных бактериологических исследований, ускоренных бактериологических, молекулярно-генетических исследований, результаты тестирования лекарственной чувствительности (ТЛЧ), частота совпадения результатов ТЛЧ, своевременность назначения исследований, сроки прекращения бактериовыделения, длительность стационарного этапа лечения.

Статистическая обработка материала исследования выполнялась на персональном компьютере с помощью пакета Statistica for Windows 10, USA.

Результаты исследования и обсуждение. При микроскопии мокроты с окраской по Цилю-Нильсену на этапе диагностики пациентов с туберкулезом удалось обнаружить КУБ у 73 пациентов из 159, что составило 45,91%. С использованием теста Xpert MTB/Rif ДНК микобактерий обнаружена у 115 из 159 пациентов с туберкулезом, что составило 72,33%, совпадение результатов бактериоскопии и Xpert MTB/Rif составило 63,52%. При этом одновременно у 111 из 115 пациентов получен результат лекарственной устойчивости к рифампицину, у 3 – устойчивость не определена, у 1 – выявлена чувствительность к рифампицину.

Было установлено, что при сочетанном использовании ускоренного бактериологического метода и теста Xpert MTB/Rif эффективность выделения возбудителя повышается и составляет 96,23% по сравнению с использованием только ускоренного бактериологического или молекулярно-генетического метода, эффективность которых составила 82,49% и 72,33% соответственно. Эффективность сочетанного использования ускоренного бактериологического метода и теста Xpert MTB/Rif сопоставима с эффективностью традиционного бактериологического метода (96,23% и 93,72% соответственно). При проведении сравнительного анализа средней скорости выделения МБТ при использова-

нии разных методов исследования установлено, что ускоренный и молекулярно-генетические методы позволяют значительно сократить время выделения МБТ, а также позволяют значительно ускорить проведение ТЛЧ МБТ и назначить адекватную схему лечения туберкулеза ($p < 0,01$).

Скорость выделения возбудителя в жидкой питательной среде Bactec MGIT 960 колебалась в пределах 6-52 суток, медиана составила 19 суток. Средний срок определения лекарственной чувствительности в системе Bactec MGIT 960 составляет от 8 до 94 дней (медиана составила 34 дня).

Продолжительность культивирования на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена колебалась в пределах 7-91 суток, медиана составила 32 дня. Определение лекарственной чувствительности МБТ культуральным методом позволяет получить положительный результат от 15 до 98 дней (медиана составила 59 суток).

Преимущество использования теста Xpert MTB/Rif для выявления МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину очевидно. Медиана срока получения результата составила 1 день.

При использовании ускоренного бактериологического и молекулярно-генетических методов сокращаются сроки с момента забора биологического материала (выявления пациента) до получения ТЛЧ в 1,49 ($p < 0,01$) и 3,30 ($p < 0,01$) раза, а так же сокращаются сроки с момента выявления пациента до начала адекватного лечения - в 1,34 ($p < 0,05$) и 2,61 ($p < 0,01$) раза соответственно.

При изучении сроков абацилляции прекращение бактериовыделения в основной группе было установлено через $42,71 \pm 5,04$ дня после начала лечения МЛУ-ТБ (медиана составила 22,0 дня), в первой группе сравнения – через $44,36 \pm 12,0$ (медиана составила 33,0 дня), во второй группе сравнения – через $71,80 \pm 21,22$ день (медиана составила 34,5 дней).

Исходы лечения – «излечен» и «лечение завершено» - зарегистрированы у 101 (63,5%) из 159 пациентов в основной группе, у 22 (73,3%) из 30 пациентов в первой группе сравнения, у 16 (72,7%) из 22 пациентов во второй группе сравнения. Существенного различия по показателю успешности лечения («излечен» и «лечение завершено») в обследуемых группах не отмечено ($p > 0,05$). Обращает внимание высокий процент отрыва от лечения (в целом 12,8%).

Сроки с момента выявления пациента до регистрации исхода «излечен» или «лечение завершено» в основной группе составили 623,92 дня, в первой группе сравнения – 649,64, во второй группе сравнения – 661,38. Применение молекулярно-генетических методов позволяет сократить сроки наблюдения и лечения пациентов на 37,5 дней.

Заключение. Таким образом, комплексный метод позволяет значительно ускорить диагностику РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, назначение адекватного лечения, сократить сроки бактериовыделения и пребывания пациентов в стационаре, что, в целом, будет способствовать повышению эффективности лечения, минимизации дальнейшей трансмиссии рифампицин-устойчивого туберкулеза, и снижению экономических затрат, связанных с лечением.

Заявляемый метод обладает экономической эффективностью за счет снижения сроков лечения пациентов с туберкулезом, так как позволяет обеспечить своевременное адекватное лечение этих пациентов в соответствии с быстро установленным спектром лекарственной устойчивости МБТ (снижение финансовых затрат на 20-25%).

Литература

1. Итоги реализации Государственной программы «Туберкулез» на 2010–2014 годы в Республике Беларусь / Г.Л. Гуревич [и др.] // ВИЧ-ассоциированный туберкулез:

эпидемиологические, клинические и социальные аспекты: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Гродно, 2015. – С. 16-18.

2. Современные аспекты туберкулеза в Республике Беларусь / Г.Л. Гуревич [и др.] // ВИЧ-ассоциированный туберкулез: эпидемиологические, клинические и социальные аспекты: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Гродно, 2015. – С. 18-20.

3. Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований для диагностики туберкулеза / Э.В. Севастьянова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 1. – С. 35-40.

4. Салина, Т.Ю. Молекулярно-генетический анализ и спектр мутаций в генах *katG*, *inhA*, *groB*, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду и рифампицину у больных туберкулезом и ВИЧ-инфекцией / Т.Ю. Салина, С.А. Чуркин, Т.И. Морозова // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – № 8. – С. 54-59.

5. Лаушкина, Ж.А. Диагностическая значимость теста GeneXpert MTB-RIF во фтизиатрической практике / Ж.А. Лаушкина, В.А. Краснов, А.Г. Чередниченко // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – № 10. – С. 37-39.

6. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. – Geneva: World Health Organization, 2011 [Electronic resource]. – Mode of access: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569_eng.pdf. – Date of access: 16.09.2019.

SIMULTANEOUS FAST DIAGNOSTICS OF TUBERCULOSIS AND DRUG RESISTANCE OF MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS ON NON-RESPIRATORY SPECIMENES AND TISSUE MATERIAL

**¹Dziusmikeyeva M.I., ¹Skrahina A.M., ¹Yashkevich N.V.,
²Zhurkin D.M., ²Michailova V.V.**

¹*Republican Scientific and Practical Centre of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Republic of Belarus*

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

An integrated method for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis using molecular genetic studies can significantly accelerate the diagnosis and the appointment of adequate treatment, reduce the time for bacterial excretion and patient stay in the hospital, which, in general, will increase the effectiveness of treatment, minimize further transmission of multidrug-resistant tuberculosis, and reduce economic costs related to treatment.

The method is cost-effective by reducing the treatment time for patients with tuberculosis, as it allows for timely adequate treatment of these patients in accordance with the rapidly established spectrum of drug resistance of *Mycobacteria tuberculosis* (reduction of financial costs by 20-25%).

Keywords: multidrug-resistant tuberculosis, molecular genetic studies, diagnostics, treatment effectiveness.

Поступила 16.09.2019

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОФИТИЙ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ СРЕДСТВАМ, АНТИСЕПТИКАМ И ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

¹Звягинцева К.Б., ²Буткевич В.В., ²Циркунова Ж.Ф.,
¹Дронина А.М., ³Максимова Н.П.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

³Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Резюме. В результате проведенных исследований были определены максимальные ингибирующие разведения исследуемых противогрибковых средств (клотримазол, 1%; тербинафина гидрохлорид, 10 мг; нафтифина гидрохлорид, 100 мг), антисептиков (хлоргексидин биглюконат, 0,05%; повидон-йод, 1%; йод, 10%), дезинфектантов (гуанидин, 3%; ЧАС; этанол, 96,4%) для изолятов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.*, которые находились в пределах 1/2-1/256. Все исследованные изоляты грибов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.* проявили высокую чувствительность к тербинафина гидрохлориду, нафтифина гидрохлориду и хлоргексидину биглюконату. Среди *Trichophyton spp.* все обладали высокой чувствительностью к комбинированному дезинфектанту и инолу. Все исследованные изоляты оказались менее чувствительными к повидон-йоду и йоду.

Ключевые слова: *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, чувствительность, противогрибковые средства, антисептики, дезинфектанты, максимальное ингибирующие разведение.

Введение. Заболевания, вызванные грибами рода *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.*, являются серьезной проблемой современной медицины [1]. Грибковые инфекции, поражающие ногти, кожные покровы и другие участки тела, – дерматомикозы – доставляют серьезную проблему в клинической практике [2]. Основными источниками инфекций являются больной человек, домашние и сельскохозяйственные животные, мышевидные грызуны. Передача дерматофитов от больных людей к здоровым осуществляется при непосредственном соприкосновении и через контаминированные предметы, с которыми контактировали больные люди и животные: контаминированное дерматофитами белье, подстилки, игрушки, банные и парикмахерские принадлежности, вода, пол, ковры и т.д. [3]. Возникают трудности в диагностике, лечении и распространении патогенных грибов. Вместе с тем для подбора адекватной терапии очень важна правильная диагностика, нельзя ставить диагноз только на основании клинической картины, так как под клинику онихомикоза могут маскироваться ониходистрофии и ряд дерматозов, так же протекающих с поражением ногтевых пластинок [4]. Грибы можно обнаружить повсеместно, они хорошо и длительное время сохраняются в окружающей среде, особенно споры грибов, которые характеризуются повышенной устойчивостью к антисептикам и дезинфектантам. Развитие устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.*, снижает эффективность терапевтических и профилактических мероприятий, что указывает на необходимость установления контроля за устойчивостью микроорганизмов не только к антибиотикам, но и к антисептикам и дезинфектантам и разработки и внедрения в практику здравоохранения методов, тормозящих рост грибов [5]. Изучение устойчивости микробной флоры к дезинфицирующим средствам является одним из важнейших направлений эпидемиологического слежения за инфекциями в медицинских учреждениях. Трудности лечения онихомико-

зов обусловлены наличием исходной устойчивости у микромицетов, которая является видовой характеристикой, и отмечается у части штаммов микроорганизмов определенного вида, или приобретенной устойчивостью [6].

Проблема снижения чувствительности к противогрибковым средствам, появления полирезистентных штаммов трихофитона и микроспорум диктует необходимость располагать данными о чувствительности «региональных» штаммов трихофитона к противогрибковым лекарственным средствам, антисептикам и дезинфектантам для проведения адекватной терапии. В Республике Беларусь такие исследования ранее не проводились.

Цель исследования: установить чувствительность возбудителей дерматофитий (*spp. Trichophyton, Microsporum*) к противогрибковым средствам, антисептикам и дезинфектантам; определить противогрибковые средства, дезинфектанты, антисептики, обладающие выраженным антимикотическим действием в отношении возбудителей дерматофитий (*spp. Trichophyton, Microsporum*).

Материалы и методы. Образцы клинического материала (соскобы кожи, фрагменты ногтей) были выделены от пациентов, находившихся на лечении в учреждении здравоохранения «Минский клинический кожно-венерологический диспансер» с диагнозом «В35.1 Микоз ногтей», «В35.2 Микоз кистей», «В35.3 Микоз стоп», «В35.4 Микоз туловища», «В35 Микроспория». Из биологических образцов культуральным методом были выделены патогенные грибы рода *Trichophyton spp.* (15) и *Microsporum spp.* (10). Для получения чистой культуры, патогенные грибы культивировали на агаре Сабуро в течение 7-10 суток и инкубировали в термостате при 27°C. Культуры дерматомицетов идентифицировали до вида по макро- и микроморфологическим признакам. После вырезались участки агара в чашке Петри с культурой и помещались в стерильные пробирки с жидкой питательной средой Сабуро, которые инкубировались 2 суток при 27°C. Разведение выполняли на жидкой питательной среде Сабуро, количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева. Суспензию вносили в размере 30 мкл в уже подготовленные 96-и луночные планшеты и инкубировали при 27°C. Появление роста дерматомицетов отмечалось с 4-го по 10-й день инкубации. Учет производили на 6, 10 и 13 сутки. При отсутствии роста в течение 30 дней результаты культивирования считались отрицательными.

Чувствительность изолятов грибов к антисептикам (хлоргексидин биглюканат, 0,05%; повидон-йод, 1%; йод, 10%), дезинфектантам (аквадез, комбинированный дезинфектант, инол) и противогрибковым средствам (клотримазол, 1%; тербинафина гидрохлорид, 10 мг; нафтифина гидрохлорид, 100 мг) была исследована с помощью метода оценки устойчивости грибов к антисептикам и дезинфектантам [7]. Оценку чувствительности к противогрибковым средствам, дезинфектантам и антисептикам проводили при экспозициях и концентрациях, рекомендуемых в инструкциях по применению дезинфицирующих средств, по максимальное ингибирующему разведению (МИР). Изоляты считали менее чувствительными при наличии роста после воздействия средства в разведении 1/2-1/4.

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенные исследования изолятов дерматофитов показали, что диапазон колебаний МИР для противогрибковых средств был от 1/4 до 1/16 для изолятов *Trichophyton spp.* и от 1/2 до 1/16 для *Microsporum spp.* МИР антисептиков находилось в пределах от 1/4 до 1/64 для изолятов *Trichophyton spp.* и от 1/2 до 1/32 для *Microsporum spp.* Диапазон колебаний МИР для дезинфектантов был более широким: от 1/4 до 1/256 для изолятов *Trichophyton spp.* и от 1/4 до 1/64 для *Microsporum spp.* (таблица).

Таблица. – Активность противогрибковых средств, антисептиков, дезинфектантов (МИР) в отношении возбудителей дерматомикозов

Возбудители дерматомикозов	Активно действующее вещество (концентрация) диапазон МИР		
	Противогрибковые средства		
	клотримазол (1%)	тербинафина гидрохлорид (10 мг)	нафтифина гидрохлорид (100мг)
<i>Trichophyton spp.</i> (n=15)	1/4-1/8	1/8-1/16	1/8-1/16
<i>Microsporum spp.</i> (n=10)	1/2	1/8-1/16	1/16
	Антисептики		
	Хлоргексидин биглюконат (0,05%)	Повидон-йод (1%)	Йод (10%)
<i>Trichophyton spp.</i> (n=15)	1/16-1/64	1/4	1/4
<i>Microsporum spp.</i> (n=10)	1/32	1/4	1/2
	Дезинфектанты		
	Аквадез (алкилдиметилбензиламмоний хлорид, 12%; полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, 3%)	Комбинированный дезинфектант (четвертичные аммонийные соединения – ЧАС)	Инол (этанол, 96,4%)
<i>Trichophyton spp.</i> (n=15)	1/4-1/8	1/8	1/64-1/256
<i>Microsporum spp.</i> (n=10)	1/4	1/2-1/16	1/4-1/64

Было установлено, что среди противогрибковых средств все испытуемые изоляты были чувствительны к тербинафина гидрохлориду и нафтифина гидрохлориду, 3 изолята из 15 *Trichophyton spp.* (МИР 1/4) и 2 изолята из 10 *Microsporum spp.* (МИР 1/2) оказались менее чувствительными к клотримазолу.

Среди антисептиков все испытуемые изоляты оказались чувствительными к хлоргексидину биглюконату: МИР *Trichophyton spp.* от 1/16 до 1/64, МИР *Microsporum spp.* 1/32. Антисептики на основе йода были менее активны в отношении всех исследуемых культур: МИР повидон-йода составило 1/4 для всех изолятов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.* МИР йода для *Trichophyton spp.* составило 1/4, для *Microsporum spp.* – 1/2.

Среди дезинфектантов все изоляты *Trichophyton spp.* были чувствительными к комбинированному дезинфектанту (МИР 1/8) и инолу (МИР 1/64-1/256). МИР 1/4 к аквадезу имели 2 изолята *Trichophyton spp.* Среди изолятов *Microsporum spp.* по два изолята были наименее чувствительны к аквадезу (МИР 1/4) и комбинированному дезинфектанту (МИР 1/2) и 1 изолят – к этанолу (МИР 1/4).

Выводы:

1. Максимальные ингибирующие разведения исследуемых противогрибковых средств (клотримазол, 1%; тербинафина гидрохлорид, 10 мг; нафтифина гидрохлорид, 100 мг), антисептиков (хлоргексидин биглюконат, 0,05%; повидон-йод, 1%; йод, 10%), дезинфектантов (гуанидин, 3%; ЧАС; этанол, 96,4%) для изолятов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.* находились в пределах 1/2-1/256.

2. Все исследованные изоляты грибов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.* проявили высокую чувствительность к тербинафину гидрохлориду, нафтифину гидрохлориду и хлоргексидину биглюконату. Среди *Trichophyton spp.* все обладали высокой чувствительностью к комбинированному дезинфектанту и инолу.

3. Среди изолятов *Trichophyton spp.* и *Microsporum spp.* были выявлены изоляты с меньшей чувствительностью к клотримазолу. Все исследованные изоляты оказались менее чувствительными к повидон-йоду и йоду. Среди изолятов *Trichophyton spp.* были менее чувствительные к аквадезу, среди *Microsporum spp.* – к комбинированному дезинфектанту и инолу.

Литература

1. Сергеев, А.Ю. Грибковые заболевания ногтей [Электронный ресурс] / А.Ю. Сергеев. – М.: Медицина для всех – Национальная академия микологии, 2001. – 164 с. – Режим доступа: <http://www.mycology.ru/nam/pdf/gzn2001.pdf>. – Дата доступа: 14.10.2019.
2. Проблемы и перспективы терапии и профилактики микозов стоп, онихомикозов / А.Ю. Сергеев [и др.] // Российский медицинский журнал. – 2004. – № 18. – С. 1085-1088.
3. На пути совершенствования лабораторной диагностики онихомикозов / А.Ю. Сергеев [и др.] // Успехи медицинской микологии. – 2006. – Т. VIII. – С. 89-90.
4. Исследование современной эпидемиологии онихомикоза / А.Ю. Сергеев [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 2002. – № 3. – С. 31-35.
5. Клинические рекомендации. Дерматовенерология. 2006-2007 / Рос. о-во дерматовенерологов / гл. ред. А.А. Кубанова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 299 с.
6. Кубанов, А.А. Результаты многоцентрового скринингового исследования этиологической структуры возбудителя онихомикоза в Российской Федерации / А.А. Кубанов, Н.В. Фриго // Вестник дерматологии и венерологии. – 2007. – № 4. – С. 611.
7. Методы оценки устойчивости грибов к антисептикам и дезинфектантам: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 28.12.2018, рег. № 230-1218 [Электронный ресурс]. – Минск: БГМУ, 2018. – 6 с. – Режим доступа: <https://www.bsmu.by/downloads/vrachu/instrukcii/2019/4.pdf>. – Дата доступа: 11.10.2019.

SENSITIVITY OF DERMATOPHYTOSIS PATHOGENS TO ANTIFUNGAL AGENTS, ANTISEPTICS, AND DISINFECTANTS

¹Zviagintseva K.B., ²Butkevich V.V., ²Tsyrcunova Zh.F.,
¹Dronina A.M., ³Maksimova N.P.

¹Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

As a result of the studies, the maximum inhibitory dilutions of the studied antifungal agents (clotrimazole (1%) terbinafine hydrochloride (10 mg) naftifine hydrochloride (100 mg)), antiseptics (chlorhexidine bigluconate (0.05%), povidone iodine (1%), were determined iodine (10%)), disinfectants (guanidine 3%, HOUR, ethanol 96.4%) for isolates of *Trichophyton spp.* and *Microsporum spp.*, which were in the range 1/2-1/256. All studied isolates of the fungi *Trichophyton spp.* and *Microsporum spp.* showed high sensitivity to terbinafine hydrochloride, naphthine hydrochloride and chlorhexidine bigluconate. Among *Trichophyton spp.* all had high sensitivity to the combined disinfectant and inol. All isolates studied were found to be less sensitive to povidone iodine and iodine.

Keywords: *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, sensitivity, antifungal agents, antiseptics, disinfectants, maximum inhibitory dilution

Поступила 14.10.2019

СЕРОТИПОВОЙ ПЕЙЗАЖ ШТАММОВ НАЗОФАРИНГЕАЛЬНЫХ ПНЕВМОКОККОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

^{1,2}Исаева Г.Ш., ^{1,2}Баязитова Л.Т., ^{1,2}Тюрин Ю.А.

¹ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Российская Федерация

Резюме. В статье представлены результаты исследования по оценке встречаемости различных серотипов циркулирующих штаммов пневмококков у детей дошкольного возраста в Республике Татарстан: доминирование «вакцинных» серотипов и появление «невакцинных» серотипов. Колонизация носоглотки детей невакцинными штаммами пневмококков отмечалась в 12,6% случаев. Существование возможных угроз, связанных с колонизацией невакцинными и нетипируемыми (инкапсулированными) вариантами пневмококков биотопа верхних дыхательных путей, ассоциированными с развитием неинвазивных и инвазивных форм, хотя и на более низком уровне в сравнении с вакцинальными штаммами, указывает на необходимость разработки вакцин нового поколения имеющих более широкий защитный спектр.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, серотипы, циркуляция, Татарстан.

Введение. Пневмококковые инфекции (ПИ) являются одной из серьезных проблем современного здравоохранения во многих странах мира [1, 2]. Резервуаром и источником возбудителя ПИ в популяции являются больные люди с любой клинической формой, бактерионосители. Дети младшего возраста и пожилые люди относятся к группе высокого риска по ПИ. Высокая восприимчивость детей объясняется тем, что капсульные антигены неиммуногенны у детей в возрасте до 2 лет [3]. Современные представления о особенностях патогенетических механизмов бактерионосительства *Streptococcus pneumoniae* у детей не позволяют прогнозировать исход персистенции пневмококка в организме и возможность развития инвазивной пневмококковой инфекции.

В зависимости от полисахаридных антигенов различают 97 серотипов пневмококков, при этом в состав пневмококковых вакцин включаются наиболее актуальные серотипы, которые ассоциируются с инвазивными пневмококковыми инфекциями. По данным исследователей, после включения пневмококковых вакцин в национальные программы иммунизации детей наблюдается увеличение иммунной прослойки не только среди детского населения, а также среди взрослых. Но несмотря на несомненные достижения вакцинопрофилактики – снижение инвазивных пневмококковых инфекций во всех возрастных группах вакцинированных и невакцинированных лиц, есть данные об увеличении частоты колонизации носоглотки невакцинными и нетипируемыми, в том числе и инкапсулированными штаммами пневмококков (3,0-19,0% случаев бессимптомного носительства).

Исследователями доказано, что серотиповой состав циркулирующих пневмококков зависит не только от страны, но и от конкретного географического региона [4-6]. Изучение региональных аспектов серотипового пейзажа *S. pneumoniae* является важным условием для оценки эффективности вакцинопрофилактики и коррекции состава вакцинного препарата.

Цель исследования – изучить серотиповой пейзаж штаммов назофарингеальных пневмококков, циркулирующих на территории Республики Татарстан.

Материалы и методы.

1. Бактериологическое исследование.

Биоматериал высевали на плотные питательные среды Columbia agar Base («Conda», Испания) с добавлением 5% крови. Посевы инкубировали в CO₂ – инкубаторе 24 часа. Фенотипическую идентификацию *S. pneumoniae* проводили на основании морфологических, культуральных данных. Для дифференциальной диагностики использовали оптохиновый тест, лизис в присутствии солей желчи [7]. Для серологической диагностики применяли латекс-агглютинацию «SlidexPneumo-Kit», («bioMerieux», Франция); постановку реакции Нейфельда с пневмококковой антисывороткой OMNI (SSI Omniserum, State Serum Institut).

2. Молекулярно-генетическое типирование.

Серотипирование штаммов проведено методом мультиплексной ПЦР. М-ПЦР проводили по схеме, представленной в работе Pai R. и соавт. (2006) [8]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 1 × ПЦР-буфер (20 mM Трис-НСl, pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 1 M дитиотреитол, 0,5% Твин 20), 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (SibEnzyme), 2,5 mM MgCl₂, 2,0 ед. TaqF ДНК-полимеразы (Promega) и праймеров с концентрациями в соответствии с рекомендациями Козлова Р.С. и соавт. (2013) [9]. В качестве матрицы использовали образцы выделенной ДНК штаммов (2,5 мкл) протокол амплификацию проводили при условиях: начальный этап- 94°C в течение 4 мин с последующим 30 циклами амплификации 94°C в течение 45 с, 54°C в течение 45 с и 65°C в течение 2 мин 30 с. Продукты амплификации определяли методом электрофореза в 2% агарозных гелях в 1 × ТАЕ-буфере (40 mM Трис, 20 mM ледяной уксусной кислоты, 1 mM EDTA, pH 8,0) при 120 В при 45 мин. Гели окрашивали бромидом этидия (0,5 мкг/мл) и регистрировали изображения. Размеры ампликонов определяли по сравнению со молекулярным стандартом ДНК маркеров (SibEnzyme).

Выделение бактериальной ДНК. Выделяли из бактериальной массы чистой культуры с использованием набора GeneFlute™ Bacterial Genomic DNA kits, Sigma, (США). Средняя концентрация геномной ДНК в М_ПЦР составила 10 нг/мкл. Концентрацию выделенной геномной ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

Получение бактериальных лизатов. Пневмококковые изоляты культивировали на 5% кровяном агаре в течение 12 час при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Бактериальные клетки суспендировали в 250 мкл ТЕ-буфера (10 mM Трис-НСl, pH 8,0) и доводили мутность до 1,0 по стандарту Макфарланда. Полученную суспензию немедленно замораживали при -20°C в течение 5 мин. Полученные лизаты сохраняли при -20°C до дальнейшего использования.

Результаты. Обследовано 585 детей, посещающих детские дошкольные учреждения, и проживающих г. Казани (n=331) и в сельской местности (n=254). Распространенность детей-носителей *S. pneumoniae* в возрастной категории от 1,5 до 3 лет составила 35,1%; в возрасте от 3 до 5 лет – 29,9%; среди детей 5-7 лет – 19,6% и среди детей старше 7 лет – 21,9%.

Проведение микробиологического обследования детей сопровождалось анкетированием родителей. Согласно данным анкет, у 82 детей отмечались рецидивирующие заболевания респираторного тракта (часто и длительно болеющие дети). Так, у 143 детей в анамнезе – бронхиты, бронхопневмонии, пневмонии. У 122 детей отмечены эпизоды острого среднего отита (один и более). Тонзиллофарингиты, риносинуситы были диагностированы у 25 обследованных детей. В выборочном исследовании по профилированию биохимических свойств изучено 52 изолята *S. pneumoniae*, полученных от детей в возрасте от 5 до 7 лет – 42 изолята (80,7%), от 7 лет и старше – 10 штаммов (19,3%) детей.

Серотиповой профиль пневмококков, выделенных в 2017 г., характеризовался следующими серотипами: 14 – 12 (23,07%), 19F – 12 (23,07%), 23F – 5 (9,6%), 7F – 2 (3,8%),

33F – 3 (5,8%), 35B – 3 (5,8%), 12F – 3 (5,8%), 16F – 6 (11,5%), 22F – 2 (3,8%), Sg18 – 1 (1,9%), нетипируемых изолятов – 3 (5,8%).

В 2018 г. серотиповой пейзаж циркулирующих в носоглотке детей-носителей (n=166) характеризовался следующим составом: 18С – в 13,2% случаев; 19F – в 12,6% случаев, 11А и 14 – по 8,79%, 7F– 9%; серотипы 6А/6В и 23F – по 7,8 %; серотип 33F – 4,8%. Таким образом, обеспечивался максимальный охват циркулирующих в носоглотке пневмококков штаммами, входящими в состав разрешенных к применению пневмококковых вакцин.

Реже выявлялись другие вакцинные серотипы: серотипы 3 и 22F – по 3,6% соответственно; 12F и 19 А – по 1,2%; у 1 ребенка выделен *S. pneumoniae* серотип 10А (0,6%). Необходимо отметить, что выявлены серотипы, не входящие в состав пневмококковых вакцин пневмококков: 13 изолятов по результатам молекулярного серотипирования отнесены к серогруппе 35В; 6 изолятов – к серогруппе 16F. Также зарегистрированы единичные случаи выделения серотипов – 31, 15А (по 3 изолята); у 1 ребенка – 35F.

Заключение. Таким образом, анализ серотипового состава пневмококков, циркулирующих у детей Республики Татарстан, выявил доминирование «вакцинных» серотипов. Колонизация носоглотки детей невакцированными штаммами пневмококков отмечалась в 12,6% случаев (21 изолят).

Существование возможных угроз, связанных с колонизацией невакцированными и нетипируемыми (инкапсулированными) вариантами пневмококков биотопа верхних дыхательных путей, ассоциированными с развитием неинвазивных и инвазивных форм, хотя и на более низком уровне в сравнении с вакцинными штаммами, указывает на необходимость разработки вакцин нового поколения имеющих более широкий защитный спектр. Перспективны исследования по разработке альтернативных вакцин, содержащих иммуногенные протеины, адгезины или другие факторы вирулентности, общие для капсулированных и нетипируемых (инкапсулированных) штаммов пневмококков.

Литература

1. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающие ведущие нозологические формы пневмококковых инфекций / Ю.В. Лобзин [и др.] // Журн. инфектологии. – 2013. – № 4. – С. 36-42.
2. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease / B. Simell [et al.] // Expert. Rev. Vaccines. – 2012. – Vol. 11, No. 7. – P. 841-855.
3. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline / G. Kapatai [et al.] // Peer. J. – 2016. – Vol. 4. – p2477. doi: 10.7717/peerj.2477.
4. Внебольничные пневмонии пневмококковой этиологии и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* у детей в Республике Татарстан / Л.Т. Баязитова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 3. – С. 271-278.
5. Муравьев, А.А. Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae* на территории Российской Федерации / А.А. Муравьев, Р.С. Козлов, Н.Н. Лебедева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 200-206.
6. Белоцерковская, Ю.Г. Пневмококковая вакцина у взрослых снижает риск инфекций, вызванных *Streptococcus pneumoniae* / Ю.Г. Белоцерковская, А.Г. Романовская, Е.А. Стырт // Клиническая медицина. – 2016. – № 1. – С. 61-66.
7. МР 4.2.0114-16. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии. – М., 2016.
8. Pai, R, Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates / R. Pai, R.E. Gertz, B. Beall // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, No. 1. – P. 124-131.
9. Результаты исследования распространенности в России внебольничной пневмонии и острого среднего отита у детей в возрасте до 5 лет (PAPIRUS) / Р.С. Козлов [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15 № 4. – С. 246-260.

SEROTYPE LANDSCAPE OF NASOPHARYNGEAL PNEUMOCOCCI STRAINS CIRCULATING ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF TATARSTAN

^{1,2}Isaeva G.Sh., ^{1,2}Bayazitova L.T., ^{1,2}Tyurin Y.A.

¹Kazan Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Kazan, Russian Federation

²Kazan State Medical University of Health Ministry of Russian Federation, Kazan, Russian Federation

The article presents the results of a study to assess the occurrence of various serotypes of circulating strains of pneumococci in preschool children in the Republic of Tatarstan: the dominance of "vaccine" serotypes and the appearance of "non-vaccine" serotypes. Colonization of children's nasopharynx with vaccine strains of pneumococci was observed in 12.6% of cases. The existence of possible threats associated with the colonization of non-vaccinated and untyped (encapsulated) variants of upper respiratory biotope pneumococci associated with the development of non-invasive and invasive forms, although at a lower level compared to vaccine strains, indicates the need to develop a new generation of vaccines with a wider protective spectrum.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, serotypes, circulation, Tatarstan.

Поступила 27.09.2019

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПИЧЕСКОГО ПЕЙЗАЖА ИЗОЛЯТОВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА МИНСКА

¹Капустина Ю.М., ¹Рубаник Л.В., ²Сухобокова Н.Н.,
²Коваленко Е.В., ¹Полещук Н.Н.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Учреждение здравоохранения «Городской клинический кожно-венерологический диспансер», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Получены данные о генотипической структуре популяции возбудителя *Chlamydia trachomatis*, выделенного от лиц, проживающих в городе Минске. При помощи генотипирования методом двухраундовой ПЦР микст-генотипный вариант хламидийной инфекции отмечен в 48,89%, моно-генотипный – в 51,11%. Выявлено преобладание генотипов E и F, общая доля которых составила 63,89%. Впервые на территории Республики Беларусь в образце биологического материала, полученного из урогенитального тракта, выявлен трахома-ассоциированный генотип A *C. trachomatis*.

Ключевые слова. *Chlamydia trachomatis*, генотип, полимеразная цепная реакция, Минск.

Введение. Вид *Chlamydia trachomatis* представлен 14 генотипами и 7 подтипами. Разделение возбудителя на группы основано на тканевом тропизме. Генитальные генотипы (D-K) обладают тропностью к эпителиальным клеткам урогенитального тракта (УГТ), тогда как глазные (A-C) – инфицируют преимущественно эпителиальные клетки конъюнктивы, а штаммы венерической лимфогранулемы (L1-L3) поражают макрофаги и локализуются главным образом в лимфатических узлах [1].

Множественное инфицирование разными генотипами *C. trachomatis* создает условия для рекомбинационных процессов, которые могут приводить к появлению новых генотипов возбудителя с новым набором аллелей. В результате рекомбинации стано-

вится возможным как исключение из генома вредных мутаций, так и приобретение полезных, несущих, к примеру, повышение адаптивных возможностей патогена к различным условиям, а также совершенствование механизмов его противостояния иммунологическому давлению со стороны организма человека.

Таким образом, определение генотипа *C. trachomatis* важно для расшифровки генотипической структуры популяции возбудителя, циркулирующего на конкретной территории. Доминирование определенных генотипов указывает на присутствие у них эффективных механизмов уклонения от иммунного ответа организма человека, что способствует их широкому распространению. Контроль и изучение циркулирующих генотипов хламидий даст возможность определить их вклад в патогенез, а также позволит усовершенствовать молекулярно-эпидемиологический надзор за хламидийной урогенитальной инфекцией.

Цель работы – установить генотипическую структуру популяции изолятов *C. trachomatis*, выделенных у жителей города Минска с использованием метода двухраундовой ПЦР.

Материалы и методы исследования. Образцы биологического материала (мазко-соскобы из УГТ) были получены от 51 пациента. Все они проживали на территории города Минска и проходили обследование в учреждении здравоохранения «Городской клинический кожно-венерологический диспансер» в период 2017-2019 гг. В ходе ПЦР-исследования у данных пациентов диагностирована урогенитальная хламидийная инфекция. Далее пробы, содержащие ДНК *C. trachomatis*, были подвергнуты генотипированию методом двухраундовой ПЦР с использованием группо- и типоспецифичных праймеров к участкам гена *ompA*, как описано ранее [2].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Количественные признаки, характеризующиеся нормальным распределением, представлены в виде средней \pm стандартная ошибка средней. Уровень достоверности полученных результатов определяли по критерию Стьюдента. Достоверными считали результаты при уровне значимости различий $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Анализ половозрастной структуры исследуемой выборки пациентов показал, что 32 (62,75%) пробы получены от лиц мужского пола, а 19 (37,25%) – от лиц женского пола. Средний возраст обследованных составил $30 \pm 6,57$ лет. В результате типирования не удалось установить принадлежность к генотипу 6 образцов, поэтому объем выборки сократился до 45. Выявленный процент случаев микст- и моно-генотипной инфекции *C. trachomatis* был примерно равным (48,89% и 51,11% соответственно). Так как в 22 (48,89%) образцах определялся более чем один генотип *C. trachomatis*, следовательно, их общее количество составило 72.

Определенные в результате исследования генотипы *C. trachomatis* распределялись следующим образом. Чаще всего выявлялись генотип E (n=29; 40,28%) и F (n=17; 23,61%). Общая доля этих генотипов *C. trachomatis* составила 63,89% (n=46). Достоверно реже – 36,11% ($p \leq 0,05$), встречались генотипы J (n=8; 11,11%), G (n=7; 9,72%), K (n=6; 8,33%), Ja (n=4; 5,56%), A (n=1; 1,39%). Аналогичное распределение генотипов описано во многих работах [1, 3-5]. Сходный генотипический пейзаж на многих территориях может быть связан с наличием специфических адгезинов или факторов вирулентности у доминирующих генотипов патогена, которые способствуют эффективному ускользанию от иммунологического надзора организма человека, что благоприятствует широкому распространению таких генотипов возбудителя. Примером подобного явления являются генотипы E и F, антигены которых обладают низким уровнем иммунореактивности, за счет чего зачастую отсутствуют клинические проявления заболевания. Такое бессимптомное течение инфекции не вызывает необходимости обращения к врачу и может благоприятствовать дальнейшему распространению хламидийной инфекции в популяции.

Следует особо отметить, что в результате проведенных исследований впервые на территории Республики Беларусь в 1 образце (1,39%) биологического материала, полученного из УГТ, обнаружен трахома-ассоциированный генотип А *C. trachomatis*.

Ранее уже сообщалось об обнаружении в Испании, Португалии и Японии штаммов *C. trachomatis*, вызывающих поражение конъюнктивы и роговицы глаза в материале из УГТ. Исследователи из Испании при расшифровке этих случаев определили, что подобное явление стало возможным вследствие рекомбинации гена *pmpH* генотипа А с аналогичным участком генотипа J [6]. Возможность штаммов *C. trachomatis*, ассоциированных с трахомой, колонизировать УГТ также связывают с происхождением от одного общего «предкового» штамма. На основании реконструкции филогенетических отношений было установлено, что исторически вид *C. trachomatis* включает в себя 2 большие клады: урогенитальная и венерической лимфогранулемы. Позже урогенитальная клада разделилась на две – Т1 и Т2. При этом, клада Т2 включала штаммы хламидий, вызывающие трахому, а Т1 – штаммы, ассоциированные с урогенитальными инфекциями [1]. Эту теорию также подтверждают данные о структуре генотип-специфичного гена цитотоксина, в котором протяженность делеции связана с тропностью *C. trachomatis*. Так, для генотипов А, Ва, В, вследствие утраты участка гена, отмечена возможность кодирования только уридиндифосфатглюкозо-связывающего домена, в то время как генитальные генотипы способны кодировать интактный цитотоксин с ГТФазным инактивирующим доменом [7].

В литературе также описаны основные гены и белки ответственные за механизмы тканевого тропизма штаммов *C. trachomatis*. К ним относят транслоцированный актин-рекрутирующий фосфопротеин (*Tarp*), 6 полиморфных мембранных белков (*pmpF*, *pmpH*, *pmpB*, *pmpC*, *pmpG*, *pmpI*) и оперон биосинтеза триптофана. Структура последнего лежит в основе различий в способности к колонизации УГТ. «Дикие» штаммы трахомы не способны выживать в условиях УГТ, где посредством каскада реакций запускаемых Т-клетками и НК-клетками организма человека происходит разрушение внутриклеточных запасов триптофана хламидий. Урогенитальные штаммы *C. trachomatis*, у которых в опероне активны все три гена *trpR*, *trpB* и *trpA*, способны восстанавливать запасы триптофана путем реакции синтеза его из индола, катализируемой ферментом триптофансинтазой (*trpBA*). У штаммов трахомы ген *trpA* имеет делецию, в результате которой синтезируется неактивный фермент триптофансинтаза и подобный путь синтеза триптофана нарушен [1].

Тем не менее, в литературе описаны штаммы *C. trachomatis*, выделенные из конъюнктивы, имеющие интактный ген *trpBA*, и штамм Да гены *pmp* которого имеют высокий процент сходства со штаммами трахомы. Исследователи связывают подобные случаи с рекомбинационными событиями, а не эволюционно-ассоциированными точечными мутациями [8]. Таким образом, рекомбинантные формы трахома-ассоциированных и урогенитальных генотипов *C. trachomatis* способны колонизировать эпителиальные клетки не только конъюнктивы, но и УГТ человека.

По данным исследователей разных стран на долю микст-генотипного варианта хламидийной инфекции приходится до 18% случаев в России, 7,5% в Кореи и от 6 до 16% в Нидерландах [5, 9, 10]. Ранее в Республике Беларусь отмечалось преобладание моно-генотипного варианта хламидийной инфекции над микст-генотипным (81,9% и 18,1% соответственно) [2]. При исследовании изолятов *C. trachomatis*, выделенных от жителей города Минска, выявлено достоверное повышение доли инфицирования более чем одним генотипом *C. trachomatis* (48,88%, $p \leq 0,05$). Такой вариант инфекции мог возникнуть вследствие неоднократного заражения одного пациента разными штаммами патогена. Очевидно, что подобное обстоятельство способствует повышению вероятности возникновения рекомбинации между аллелями геномов хламидий и благоприятствует появлению новых геновариантов *C. trachomatis*.

Выводы. Методом двухраундовой ПЦР получены первичные сведения о генотипической структуре *C. trachomatis* в городе Минске. Установлено значительное доминирование генотипов E (n=29; 40,28%) и F (n=17; 23,61%). Выявлено примерно равное процентное соотношение количества случаев с микст- и моно-генотипной инфекцией *C. trachomatis* (48,89% и 51,11% соответственно). В сопоставлении с данными по Республике Беларусь, отмечено достоверное повышение доли инфицирования более чем одним генотипом *C. trachomatis* – 48,88% против 18,1% ($p \leq 0,05$). Этот факт может обуславливать создание благоприятной среды для образования и распространения в популяции рекомбинантных форм *C. trachomatis*.

Впервые на территории Республики Беларусь в образце биологического материала УГТ человека выявлен генотип А (1 случай, 1,39%), ассоциированный с трахомой. Планируются дальнейшие исследования данного изолята с целью характеристики структуры основных генов, ответственных за механизмы тканевого тропизма.

Таким образом, полученные результаты распределения генотипов *C. trachomatis* представляют не только эпидемиологический интерес, но также имеют большое клиническое значение для установления связи патогенетических особенностей течения урогенитальной хламидийной инфекции с генотипом возбудителя. Практический интерес представляют данные о рекомбинационных процессах в геноме возбудителя, способных изменять его важнейшие особенности – вирулентность и патогенность.

Литература

1. Unveiling the multilocus sequence typing (MLST) schemes and core genome phylogenies for genotyping *Chlamydia trachomatis* / L.H. Patiño [et al.] // Front. Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 1854. doi: 10.3389/fmicb.2018.01854
2. Капустина, Ю.М. Генотипирование *Chlamydia trachomatis* методом двухраундовой ПЦР / Ю.М. Капустина, Л.В. Рубаник, Н.Н. Полещук // Современные аспекты здоровьесбережения: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвяще. 55-летию медико-профилактич. факультета, Минск, 23-24 мая 2019 г. – Минск: БГМУ, 2019.
3. Литовченко, О.А. Генотипирование *Chlamydia trachomatis*, выявленных в образцах, полученных у больных с урогенитальной патологией в северо-восточном регионе Украины / О.А. Литовченко // Annals of Mechnikov Institute. – 2011. – Т. 4. – С. 314-315.
4. Comparison of reverse hybridization and *ompA* sequencing methods applied on *Chlamydia trachomatis* strains from Tunisia / H. Gharsallah [et al.] // Microbiology Open. – 2017. – Vol. 7, iss. 2. – e00549. <https://doi.org/10.1002/mbo3.549>
5. Urogenital *Chlamydia trachomatis* multilocus sequence types and genovar distribution in chlamydia infected patients in a multi-ethnic region of Saratov, Russia / V.A. Feodorova [et al.] // Plos One. – 2018. – Vol. 13, No. 4. – e0195386. doi: 10.1371/journal.pone.0195386
6. *Chlamydia trachomatis* genotypes A and B from urogenital specimens of patients in Spain: molecular characterization / L. Piñeiro [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2018. – Vol. 24, No. 8. – 910.e5-910.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.025.P. 910.e5–910.e8.
7. Polymorphisms in the *Chlamydia trachomatis* cytotoxin locus associated with ocular and genital isolates / J.H. Carlson [et al.] // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 72, No. 12. –P. 7063-7072.
8. Sherchand, S.P. Ammonia generation by tryptophan synthase drives a key genetic difference between genital and ocular *Chlamydia trachomatis* isolates / S.P. Sherchand, A. Aiyar // PNAS. – 2019. – Vol. 116, No. 25. – P. 12468-12477.
9. OmpA genotyping of *Chlamydia trachomatis* from Korean female sex workers / G. Lee [et al.] // J. Infect. – 2006. – Vol. 52, No. 6. – P. 451-454.
10. High prevalence of co-infections by invasive and non-invasive *Chlamydia trachomatis* genotypes during the lymphogranuloma venereum outbreak in Spain / M. Rodriguez-Dominguez [et al.] // Plos One. – 2015. – Vol. 10, No. 5. – e0126145. doi: 10.1371/journal.pone.0126145

CHARACTERISTICS OF THE GENOTYPICAL STRUCTURE OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ISOLATES, OBTAINED FROM MINSK RESIDENTS

¹Kapustina Yu.M., ¹Rubanik L.V., ²Sukhobokova N.N.,
²Kovalenko E.V., ¹Poleshchuk N.N.

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

²City Clinical Skin and Venereal Diseases Clinic, Minsk, Republic of Belarus

Data were obtained on the genotypic structure of the population of *Chlamydia trachomatis* isolated from individuals living in Minsk. Using genotyping by double-round PCR – the mixed genotypic variant of chlamydial infection was detected in 48.89%, mono-genotypic in 51.11%. The predominance of genotypes E and F was revealed, the total share of which was 63.89%. In a sample of biological material obtained from the urogenital tract, trachoma-associated *C. trachomatis* genotype A was revealed for the first time in the Republic of Belarus.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, genotype, polymerase chain reaction, Minsk.

Поступила 26.09.2019

КОКЛЮШ: ПРИЧИНЫ РОСТА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ

Колодкина В. Л., Мартынов В. С.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Коклюш является вакциноуправляемой инфекцией с конца 1940-х годов. Тем не менее, заболевание все еще является эндемическим во всех странах и сохраняется цикличность. Анализ случаев коклюша, зарегистрированных в 2012-2018 гг., показал, что показатель на 100 000 населения лабораторно подтвержденных случаев коклюша был выше и составил 5,27; 1,37; 4,08; 4,89; 6,42; 5,5 и 6,8 соответственно в 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017 и 2018 гг. против 1,62; 1,29; 0,96; 1,18; 1,59 соответственно в 2007, 2008, 2009, 2010, 2011 гг. Факторы, которые способствовали увеличению числа случаев в Беларуси в период 2012-2018 гг. включают более высокую осведомленность о заболевании, улучшение системы эпиднадзора с использованием высокочувствительных и специфичных методов для верификации случаев коклюша – мультиплексной TaqMan ПЦР реального времени и ИФА для выявления антител класса G к коклюшному токсину. Кроме того, факторами, способствовавшими возрождению коклюша в стране, являются экспансия штаммов *Bordetella pertussis*, антигенно отличных от штаммов *B. pertussis*, используемых для производства АКДС-вакцины, и высокая доля (23,8%) не привитых против коклюша детей, подлежащих вакцинации по возрасту, среди заболевших.

Ключевые слова: коклюш, показатель заболеваемости, *Bordetella pertussis*, генетическая изменчивость.

Введение. Коклюш – вакциноуправляемая инфекция. Вакцинация началась с конца 1940-х годов в Северной Америке, с конца 1950-х годов в Европе и с 1974 г. в рамках Расширенной программы иммунизации (РПИ) в остальном мире. Несмотря на высокий охват вакцинацией, заболевание все еще является эндемическим во всех странах и сохраняется цикличность каждые три-пять лет, независимо от типа используемых вакцин

против коклюша и даже после введения эффективных программ вакцинации. Интенсивность циклов варьирует между регионами в основном из-за демографических различий, разного уровня охвата вакцинацией и различий в эпидемиологическом надзоре за заболеванием, если таковой осуществляется [1, 2].

Учитывая сложность эпидемиологии и диагностики коклюша, рекомендуемый минимальный стандартный эпиднадзор в большинстве стран – это дозорный надзор за ситуацией с лабораторным подтверждением в одном или нескольких дозорных учреждениях с акцентом на госпитализированных детей в возрасте до 5 лет, среди которых регистрируется наибольшее число тяжелых случаев. Выбор в пользу дозорного надзора основывается на множестве факторов, включая цели эпиднадзора, охват населения, специализацию и способность проводить лабораторные диагностические исследования. В странах с большим объемом ресурсов или особым интересом к информированию о своей программе вакцинации против коклюша проводится усиленный эпиднадзор, что означает переход от дозорного к национальному. При этом проводится надзор за всеми случаями подозрительными на коклюшную инфекцию, включая все возраста, а также амбулаторных больных.

В последнее время в некоторых странах с постоянным высоким уровнем охвата бесклеточной коклюшной вакциной наблюдается возрождение регистрации случаев коклюша даже после введения изменений в практику диагностики и наблюдения за инфекцией [3]. Это подчеркивает важность проведения эпиднадзора в условиях многолетнего проведения вакцинации против коклюша. Каждая страна в силу своих возможностей и задач проводит эпиднадзор за коклюшной инфекцией. Проведенный ВОЗ анализ данных из 19 стран с высоким и средним уровнем дохода показал, что в большинстве стран, где в течение нескольких последних лет отмечалось увеличение числа случаев коклюша, было связано с естественными циклическими изменениями. Факторы, которые способствовали увеличению числа зарегистрированных случаев, включали более высокую осведомленность о заболевании, улучшение системы эпиднадзора и повышение диагностической чувствительности лабораторных методов диагностики с внедрением полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В настоящее время возможные причины, лежащие в основе возрождения коклюша широко обсуждаются, и включают утрату протективного иммунитета в результате вакцинации или перенесенного заболевания, адаптацию возбудителя коклюша в условиях вакцинации, асимптоматическую трансмиссию *Bordetella pertussis* от лиц, вакцинированных современными бесклеточными вакцинами, улучшение диагностики и снижение охвата прививками [4, 5]. Вклад каждой из этих причин в возрождение коклюша, вероятно, варьирует в разных странах.

Цель исследования – оценить причины роста зарегистрированных случаев коклюшной инфекции в Республике Беларусь в период 2012-2018 гг., в сравнении с предыдущими годами.

Материалы и методы. За период 2012-2018 гг. в лабораторию вакциноуправляемых инфекций поступил клинический материал от 7 908 пациентов с подозрением на коклюш/паракоклюш, в том числе 6 187 носоглоточных мазков для исследования методом ПЦР и 1 721 сыворотка крови для исследования в ИФА. Диагностика коклюша основывалась на следующих критериях:

- наличие в носоглоточных мазках ДНК возбудителя коклюша и отсутствие ДНК возбудителя паракоклюша в мультиплексной TaqMan ПЦР реального времени;

- наличие в сыворотке крови антител класса G к коклюшному токсину в диагностическом титре 100 МЕ/мл и более при исследовании одной сыворотки крови, взятой в интервале от последней прививки 1 год и более;

- 4-х кратное нарастание титра антител класса G при исследовании парных сывороток крови.

Выявление одного или нескольких лабораторных критериев у пациента с клиническими признаками заболевания считали лабораторным подтверждением диагноза.

Результаты и их обсуждение. До 2012 г. в Республике Беларусь ежегодно регистрировалось от 70 до 151 случаев коклюша и от 2 до 3 случаев паракоклюша. Начиная с 2012 г. в стране для верификации случаев коклюша/паракоклюша наряду с бактериологическим методом широко использовались такие высокочувствительные и специфичные методы как ПЦР и ИФА. Анализ случаев коклюша, зарегистрированных в 2012-2018 гг., показал, что показатель на 100 000 населения лабораторно подтвержденных случаев коклюша был выше и составил 5,27; 1,37; 4,08; 4,89; 6,42; 5,5 и 6,8 соответственно в 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017 и 2018 гг. против показателя заболеваемости 1,62; 1,29; 0,96; 1,18; 1,59 соответственно в 2007, 2008, 2009, 2010, 2011 гг. Возможно, рост регистрации случаев коклюша в стране в первую очередь обусловлен использованием трех лабораторных методов при диагностике коклюшной инфекции, которые обеспечивают высокую эффективность выявления случаев данной инфекции.

Вакцинация является главной движущей силой, обуславливая антигенную дивергенцию циркулирующих и вакцинных штаммов и появление штаммов с более вирулентными свойствами. Нельзя исключить влияние адаптации возбудителя коклюша в условиях длительной иммунизации на эффективность вакцинации, что может способствовать возрождению инфекции. Показано, что повышение фитнеса *B. pertussis* ассоциировано с невакцинными аллелями генов коклюшного токсина, пертактина, фимбрий, и это, по-видимому, обеспечивает им широкую циркуляцию в популяции вакцинированных лиц. Однако, в настоящее время не известно, насколько существенно полиморфизм в вирулент-ассоциированных генах, вовлекаемых в процесс адаптации возбудителя в условиях иммунизации, может влиять на эффективность используемых вакцин.

Проведенный сравнительный анализ генетической структуры семи генов вирулентности у клинических изолятов *B. pertussis*, изолированных в Республике Беларусь, и штаммов *B. pertussis*, используемых для производства АКДС-вакцины, показал несоответствие генетической структуры по шести из семи анализируемых генов, исключая *tcfA* ген. По структуре этого гена все 100,0% клинических изолятов характеризовались «вакцинным» *actA2* аллелем гена. По структуре генов *ptxA*, *ptxC* все клинические изоляты *B. pertussis*, несли новый «невакцинный» *ptxA1* и *ptxC1* аллель гена. По структуре *ptxP*, кодирующего промоторную область коклюшного токсина, большинство клинических изолятов характеризовалась новым «невакцинным» *ptxP3* (73,7%) или *ptxP22* (10,5%) аллелями гена. По структуре гена пертактина, также большинство (83,2%) клинических изолятов несли «невакцинный» *prn2* аллель. Только 15,8 % изолятов в популяции имели «вакцинный» *prn1* аллель гена. По структуре генов *fim2* и *fim3*, популяция изолятов в большинстве случаев (89,2% и 63,2 %) представлена «вакцинными» аллелями генов. Однако 10,5% и 36,8% клинических изолятов несли новые «невакцинные» *fim2-2* и *fim3-2* аллели генов соответственно.

Анализ лабораторно подтвержденных случаев показал, что среди 3 138, зарегистрированных в период 2012-2018 гг. число не привитых заболевших составило 38,9% (1 221 из 3 138), в том числе не привитые по возрасту лица (0-4 месяца) составили 15,1% (473

из 3 138). При этом высокая доля среди заболевших – 23,8% (748 из 3 138) приходилась на детей старших возрастов, которые были не привиты, что также отразилось на уровне заболеваемости коклюшем в стране.

Заключение. В годы проведения расширенной диагностики коклюшной инфекции (2012-2018 гг.) число выявленных случаев было выше, в сравнении с предыдущими годами (2007-2011 гг.). Факторами, обусловившими повышение регистрации случаев коклюша в стране, явились улучшение диагностики коклюшной инфекции с использованием методов ПЦР и ИФА, антигенная дивергенция циркулирующих штаммов *B. pertussis* от вакцинных штаммов *B. pertussis*, используемых в производстве АКДС-вакцины, высокая доля не привитых против коклюша лиц среди заболевших.

Литература

1. Impact of vaccination and birth rate on the epidemiology of pertussis: a comparative study in 64 countries / H. Broutin [et al.] // Proc. Biol. Sci. – 2010. – Vol. 277, No. 1698. – P. 3239–3245. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0994>
2. Fine, P.E. The recurrence of whooping cough: possible implications for assessment of vaccine efficacy / P.E. Fine, J.A. Clarkson // Lancet. – 1982. – Vol. 1, No. 8273. – P. 666–669.
3. World Health Organization. Pertussis vaccines: WHO position paper. August 2015 // Wkly Epidemiol. Rec. – 2015. – Vol. 90, No. 35. – P. 433-458. [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf?ua=1>. – Date of access: 10.10.2019.
4. Mooi, F.R. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin / F.R. Mooi, N.A. Van Der Maas, H.E. De Melker // Epidemiol. Infect. – 2014. – Vol. 142, No. 4. – P. 685-694.
5. Althouse, B.M. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis* / B.M. Althouse, S.V. Scarpino // BMC Medicine. – 2015. – Vol. 13. – P. 146-158.

WHOOPING COUGH: REASONS FOR MORBIDITY INCREASE

Kolodkina V.L., Martinov V.S.

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

This paper describes the epidemiology of laboratory-confirmed pertussis in Belarus during the period from 2012 to 2018 when polymerase chain reaction (PCR) and ELISA methods were used for the diagnosis of infection. Factors that have probably contributed to the increasing numbers of recorded cases in Belarus include higher disease awareness, improved surveillance sensitivity, and the enhanced diagnostic sensitivity of PCR and ELISA tests. Additional factors of pertussis resurgence are the expansion of *B. pertussis* strains antigenically distinct from those in the vaccine and high proportion of unvaccinated children.

Keywords: whooping cough, incidence rate, vaccination, *Bordetella pertussis*, genetic changes.

Поступила 10.10.2019

НОВЫЕ СХЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ШИРОКО ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

¹Скрягина Е.М., ¹Солодовникова В.В., ¹Климук Д.А., ¹Ветушко Д.А.,
¹Якубеня О.Н., ²Журкин Д.М., ²Михайлова О.В., ²Дюсьмикеева М.И.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Были разработаны схемы лечения широко лекарственно-устойчивого туберкулеза легких (ШЛУ-ТБ) с применением новых противотуберкулезных лекарственных средств (ПТЛС). Одним из основных принципов составления схемы химиотерапии являлось назначение как минимум четырех эффективных ПТЛС резервного ряда, включая инъекционные ПТЛС и фторхинолоны. Сроки абациллирования пациентов в основной группе исследования были короче, а частота абациллирования выше. Положительная рентгенологическая динамика наблюдалась чаще в основной группе исследования. Для повышения эффективности лечения пациентов с ШЛУ-ТБ, снижения доли неудачных исходов лечения, смертности и предотвращения распространения ШЛУ-ТБ в Республике Беларусь крайне необходимо внедрение разработанных схем лечения с включением новых и перепрофилированных ПТЛС.

Ключевые слова: туберкулез, широкая лекарственная устойчивость, противотуберкулезные лекарственные средства, эффективность новых схем лечения.

Введение. Туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью, вызываемый микобактериями туберкулеза (МБТ), устойчивыми одновременно к изониазиду, рифампицину, любому фторхинолону и любому инъекционному противотуберкулезному лекарственному средству резервного ряда, является в настоящее время серьезной проблемой. Возможности применения химиотерапии при ШЛУ-ТБ ограничены, а результаты лечения крайне неудовлетворительны [1]. На сегодняшний момент остается актуальным вопрос использования новых эффективных лекарственных средств в борьбе с резистентным туберкулезом. Мета-анализ результатов лечения (560 пациентов с ШЛУ-ТБ), выполненный Jacobson K. et al., показал, что лечение имеет благоприятный исход (излечение либо лечение завершено) только в 43,7% случаях [2]. Пятилетняя выживаемость пациентов с данной формой туберкулеза, по данным других авторов, составляет менее 20% [3].

В результате двух исследований [4, 5] по надзору за лекарственной устойчивостью МБТ в Республике Беларусь установлен очень высокий уровень множественно лекарственно-устойчивого туберкулеза (МЛУ-ТБ), т.е. туберкулеза, вызываемого МБТ, устойчивыми по меньшей мере одновременно к изониазиду и рифампицину, среди вновь выявленных (32,3%) и ранее леченных (75,6%) пациентов. Впервые получены достоверные данные о распространенности ШЛУ-ТБ среди пациентов с рифампицин-устойчивым туберкулезом (РУ-ТБ): доля ШЛУ-ТБ среди вновь выявленных пациентов в республике составила 7,6%, среди ранее леченных - 16,1% [5].

При оценке результатов лечения пациентов с ШЛУ-ТБ, взятых на лечение в 2014 г. в Республике Беларусь (по данным электронного регистра «Туберкулез») было выявлено, что доля успешного лечения составила всего 37%, а доля случаев неудачи в лечении и смертельных исходов – 41% и 14% соответственно.

Существенная роль в повышении эффективности химиотерапии у лиц с РУ-ТБ принадлежит внедрению в практику новых ПТЛС. В области разработки лекарственных

средств для лечения РУ-ТБ произошли изменения и в настоящее время достигнут большой прогресс в мире - были одобрены два новых ПТЛС - бедаквилин и деламанид [6].

Бедаквилин (Bdq) является первым, принципиально новым лекарственным средством для лечения туберкулеза за последние 40 лет. Данное ПТЛС относится к группе диарилхинолинов — новому классу противотуберкулезных соединений. Бактерицидное действие обусловлено специфическим ингибированием протонной помпы АТФ-синтазы МБТ. В конце 2012 г. препарат был одобрен Администрацией США по продуктам питания и лекарственным средствам в качестве одного из компонентов режимов лечения РУ-ТБ [7]. Бедаквилин зарегистрирован в Республике Беларусь в декабре 2018 г.

Вторым новым ПТЛС является деламанид (Dlm) – производное нитродигидроимидазооксазола. Механизм действия основан на подавлении синтеза клеточной стенки МБТ. Деламанид высокоактивен в отношении внутриклеточных МБТ в макрофагах. Препарат был одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам в 2013 г. для лечения пациентов с МЛУ/ШЛУ-ТБ [8].

Цель работы: разработка схем лечения туберкулеза легких с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя с применением новых ПТЛС и последующее внедрение разработанных схем в практику противотуберкулезной службы республики для повышения эффективности лечения, снижения инвалидизации и смертности у пациентов с ШЛУ-ТБ.

Материалы и методы исследования. Апробация новых схем лечения осуществлялась на базе клиники ГУ «РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии». При апробации новых схем было набрано 75 пациентов с ШЛУ-ТБ. Сроки наблюдения за пациентами основной группы исследования составили от 1 до 12 месяцев.

Для проведения сравнения эффективности лечения пациентов на новых схемах лечения была ретроспективно набрана группа пациентов с ШЛУ-ТБ, начавших лечение в 2013-2014 гг., составившая 50 пациентов. В настоящее время все пациенты контрольной группы закончили курс лечения. Сроки лечения составили от 12 до 24 месяцев.

Результаты исследования и обсуждение. Назначение лечения пациентам с ШЛУ-ТБ проводилось с учетом разработанных схем лечения с применением новых и перепрофилированных ПТЛС, а также по решению республиканского консилиума по МЛУ-ТБ. Одним из основных принципов составления схемы химиотерапии являлось назначение как минимум четырех эффективных ПТЛС резервного ряда, включая инъекционные ПТЛС и фторхинолоны. Большее количество ПТЛС назначалось при невозможности подбора четырех эффективных ПТЛС в схему лечения. Курс химиотерапии условно был разделен на две части: интенсивная фаза, которая включала Bdq и/или Dlm на протяжении 5,5 месяцев и инъекционное ПТЛС или имипенем/циластатин (Imp), и фаза продолжения, связанная с отменой новых ПТЛС, инъекционных ПТЛС и Imp. Интенсивная фаза, как правило, составляла от 6 до 8 месяцев. При необходимости и невозможности подобрать четыре эффективных ПТЛС на фазу продолжения, Bdq/Dlm и Imp могли назначаться на весь курс лечения.

Пациентам основной группы исследования были назначены следующие варианты разработанных схем лечения (таблица).

Как видно из таблицы, все схемы лечения пациентов с ШЛУ-ТБ для 75 набранных на исследование пациентов включали Lzd, Cfz и новые ПТЛС – Bdq и/или Dlm.

Таблица. – Схемы лечения пациентов основной группы исследования

<i>Варианты схем</i>	<i>Кол-во па- циентов</i>	<i>Схемы</i>
При сохраненной чувствительности к Km, Cm и фторхинолонам	3	Bdq Lzd Cfz Cm Cs Bdq Lzd Cfz Cm Imp Amx/Clv
При сохраненной чувствительности к Am, Cm и фторхинолонам	8	Bdq Lzd Cfz Lfx/Mfx Cm/Am Cs Bdq Lzd Cfz Lfx Cm Cs Pto
При сохраненной чувствительности к Cm и фторхинолонам	5	Bdq Lzd Cfz Mfx/Lfx Cm Cs Pto Bdq Dlm Lzd Cfz Imp Amx/Clv Bdq Lzd Cfz Mfx/Lfx Cs Pto Bdq Dlm Lzd Cfz Mfx/Lfx
При сохраненной чувствительности к фторхинолонам	28	Dlm Lzd Cfz Lfx/Mfx Imp Amx/Clv Bdq Dlm Lzd Cfz Imp Amx/Clv Dlm Lzd Cfz Lfx/Mfx Cs Bdq Lzd Cfz Am Cs Bdq Lzd Cfz Lfx Cs Pto
При сохраненной чувствительности только к Mfx	11	Bdq Dlm Lzd Cfz Mfx Imp Amx/Clv Bdq Dlm Lzd Cfz Mfx Bdq Lzd Cfz Mfx Cs
При устойчивости к препаратам I ряда фторхинолонам и инъекционным ПТЛС	20	Bdq Dlm Lzd Cfz Imp Amx/Clv Bdq Lzd Cfz Cs Imp Amx/Clv Bdq Dlm Lzd Cfz Am Cs Pto Bdq Lzd Cfz Lfx/Mfx Cs

Примечания: Bdq – бедаквиллин; Dlm – деламанид; Lzd – линезолид; Cfz – клофазимин; Am – амикацин; Km – канамицин; Cm – капреомицин; Lfx – левофлоксацин; Mfx – моксифлоксацин; Cs – циклосерин; Pto – протионамид; Z – пиперазид; Imp – имипенем/циластатин; Amx/Clv – амоксициллин/клавулановая кислота.

Предварительные результаты лечения показали, что сроки абациллирования пациентов в основной группе исследования были короче, чем в контрольной группе, а частота абациллирования выше. Так процент абациллирования в основной группе исследования составил 92%, в контрольной группе – 80%. При этом доля пациентов, абациллированных после первого месяца лечения, так же была выше в основной группе исследования по сравнению с контрольной (76% и 48% соответственно), как среди впервые выявленных (82% и 58% соответственно), так и ранее леченных пациентов (68% и 31% соответственно).

Положительная рентгенологическая динамика наблюдалась чаще в основной группе исследования и составила 82% у пациентов, получавших лечение 3 месяца и более (среди впервые выявленных – 87%; среди ранее леченных – 71%). В контрольной группе этот показатель был ниже и составил 70% (среди впервые выявленных – 76%; среди ранее леченных – 56%).

Заключение. Несмотря на непродолжительное время наблюдения за пациентами на апробируемых схемах лечения (от 1 до 12 месяцев лечения) можно предварительно сказать о высокой эффективности новых схем лечения для пациентов с ШЛУ-ТБ.

Таким образом, для лечения пациентов с ШЛУ-ТБ крайне необходимо внедрение разработанных схем лечения с включением новых и перепрофилированных ПТЛС для повышения эффективности лечения, снижения доли неудачных исходов лечения, смертности и предотвращения распространения ШЛУ-ТБ в Республике Беларусь.

Літэратура

1. WHO Global Task Force on XDR-TB. Meeting (2006 Geneva Switzerland), World Health Organization. Report of the meeting of the WHO Global Task Force on XDR-TB, Geneva, Switzerland, 9–10 October 2006. (WHO/HTM/TB/2007.375). – Geneva: World Health Organization, 2007. – 25 p.
2. Treatment outcomes among patients with extensively drug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis / K.R. Jacobson [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 51, No. 1. – P. 6-14. doi: 10.1086/653115
3. Chan, E.D. treatment outcomes in extensively resistant tuberculosis / E.D. Chan, M.J. Strand, M.D. Iseman // N. Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 359. – P. 657-659. doi: 10.1056/NEJMc0706556
4. The Use of Bedaquiline in the Treatment of Multidrug Resistant Tuberculosis / Expert Group Meeting Report, WHO, 29-30 January 2013, Geneva.
5. The Contribution of Bedaquiline to the Treatment of MDRTB /WHO/STB Expert Group Meeting Geneva, 29-30 January 2013.
6. Tough decisions on essential medicines in 2015 / N. Magrini [et al.] // Bull. WHO. – 2015. – Vol. 93. – P. 283-284. doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.15.154385>
7. FDA approval of Bedaquiline – the benefit–risk balance for drug-resistant tuberculosis / E. Cox [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2014. – Vol. 371. – P. 689-691. doi: 10.1056/NEJMp1314385
8. Drug Discovery & Development. EMA Recommends Two New Tuberculosis Treatments. November 22, 2013.

THE NEW SCHEMES OF TREATMENT OF PATIENTS WITH EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT LUNG TUBERCULOSIS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

¹Skrahina A.M., ¹Solodovnikova V.V., ¹Klimuk D.A., ¹Viatushka D.A.,
¹Yakubenya A.M., ²Zhurkin D.M., ²Michailova V.V., ²Dziusmikeyeva M.I.

¹*Republican Scientific and Practical Centre of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Republic of Belarus*

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

Treatment regimens have been developed for extensively drug-resistant pulmonary tuberculosis (XDR-TB) using new anti-tuberculosis drugs. One of the main principles of the chemotherapy regimen was the appointment of at least four effective reserve-based anti-tuberculosis drugs, including injectable drugs and fluoroquinolones. The terms of abacillation of patients in the main group of the study were shorter, and the frequency of abacillation was higher.

Positive radiological dynamics was observed more often in the main group of the study. To increase the effectiveness of treatment for patients with XDR-TB, to reduce the share of unsuccessful treatment outcomes, mortality, and to prevent the spread of XDR-TB in the Republic of Belarus, it is imperative to introduce developed treatment regimens with the inclusion of new and redesigned PTLs.

Keywords: tuberculosis, extensively drug resistance, anti-TB drugs, the effectiveness of new treatment regimens

Поступила 16.09.2019

ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛИСТИНА В ОТНОШЕНИИ КОЛИСТИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* АНТИБИОТИКАМИ РАЗНЫХ ГРУПП

Тапальский Д.В., Петровская Т.А.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Выполнено определение минимальных подавляющих концентраций колистина в присутствии фиксированных концентраций антибиотиков разных групп в отношении колистинорезистентных карбапенемазопродуцирующих штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Показана способность макролидов и рифампицина значительно потенцировать антимикробную активность колистина.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, колистин, рифампицин, макролиды.

Введение. Широко распространившиеся в организациях здравоохранения Республики Беларусь карбапенеморезистентные энтеробактерии и грамотрицательные неферментирующие бактерии (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) обладают ассоциированной устойчивостью к большинству не бета-лактамов антибиотиков [1]. Сцепление генов карбапенемаз с другими детерминантами резистентности во многих случаях сопровождается развитием экстремальной антибиотикорезистентности (XDR – extensively drug resistance). До настоящего времени только полимиксины (колистин, полимиксин Б) сохраняют приемлемую микробиологическую активность в отношении многих карбапенеморезистентных госпитальных изолятов грамотрицательных бактерий. На фоне вынужденного широкого использования полимиксинов для лечения инфекций, вызванных XDR-микроорганизмами, в Беларуси отмечено появление отдельных устойчивых к ним штаммов *K.pneumoniae* со сформировавшимся состоянием полной устойчивости к антибиотикам (pandrug resistance, PDR) [0, 0]. Устойчивость *K.pneumoniae* к полимиксинам может быть связана с несколькими механизмами. Основным из них является модификация мишени, регулируемая комплексом генов, получившим общее название «система модификации ЛПС». Модификация ЛПС обусловлена мутациями в генах, обеспечивающих созревание липида А (*lpxM* и его регулятор *ramA*), а также включением в состав липида А аминокислоты (гены *pbgP*, *pmrE*), фосфоэтаноламина (*pmrC*) или пальмитата (*pagP*). Для XDR штаммов грамотрицательных бактерий с выявленной устойчивостью к полимиксинам рекомендуется выполнение дополнительных подтверждающих исследований с привлечением фенотипических и молекулярно-биологических методов [3].

При терапии инфекций, вызванных XDR грамотрицательными возбудителями, использование комбинированной антибиотикотерапии как правило является единственно возможным эффективным способом лечения. Это связано с тем, что антибиотики, к которым у микроорганизма сохраняется чувствительность, имеют серьезную токсичность и/или сложную фармакокинетику, не позволяющую создавать требуемые бактерицидные концентрации в очаге инфекции [4]. В систематическом обзоре и метаанализе, рассматривающем взаимодействия полимиксинов и карбапенемов, синергидная активность данных комбинаций определена для 44% из 146 карбапенеморезистентных XDR штаммов *K. pneumoniae*. При этом для штаммов, сохраняющих чувствительность к колистину, синергизм комбинаций карбапенемов с колистином отмечен в 55% случаев [5]. Наиболее эффективными в отношении XDR штаммов *K.pneumoniae* в экспериментах *in vitro* были комбинации полимиксинов (колистина или полимиксина Б) с

рифампицином. Независимо от преобладающих механизмов антибиотикорезистентности и используемых методов определения чувствительности, синергидный эффект этих комбинаций был отмечен для 100% исследуемых штаммов в экспериментах, выполненных в США, Южной Корее, Аргентине, Италии [0, 7].

Показана способность катионных пептидов (аналогов полимиксинов) значительно потенцировать антибактериальную активность целого ряда антибиотиков (макролидов, фузидиевой кислоты, мупироцина, рифампицина) в отношении грамотрицательных бактерий [8]. Требуется проведение микробиологических исследований для поиска синергидных комбинаций антибиотиков, оказывающих бактерицидное действие на колистинорезистентные XDR штаммы *K. pneumoniae*.

Цель исследования – выявление антибиотиков, способных потенцировать антибактериальную активность колистина в отношении экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*.

Материалы и методы исследования. Из рабочей коллекции отобрано 10 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 2016-2018 гг от госпитализированных пациентов в организациях здравоохранения Минска и Гомеля. Все штаммы были устойчивы к карбапенемам (МПК меропенема >8 мкг/мл) и имели фенотипы множественной (MDR) или экстремальной (XDR) антибиотикорезистентности. У всех включенных в исследование штаммов устойчивость к карбапенемам была обусловлена продукцией карбапенемазы: OXA-48 – у 6 штаммов, NDM – у 1 штамма, сочетание OXA-48 и NDM – у 2 штаммов, KPC – у одного штамма. Все отобранные штаммы имели высокие уровни устойчивости к колистину (МПК 16-128 мкг/мл).

Определение минимальных подавляющих концентраций антибиотиков выполняли методом последовательных микроразведений в бульоне. Двукратные последовательные разведения антибиотиков готовили в бульоне Мюллер-Хинтон (BD, США), тестирование проводили в стерильных круглодонных 96-луночных полистироловых планшетах (Sarstedt, Германия) в соответствии с ISO 20776-1:2006 [9]. Контроль качества определения чувствительности производили с использованием референтных штаммов Американской коллекции типовых культур *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *E. coli* ATCC 25922.

Для оценки способности антибиотиков различных групп потенцировать активность колистина в отношении колистинорезистентных штаммов выполнено определение МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации второго антибиотика, соответствующей его фармакокинетической/фармакодинамической (ФК/ФД) концентрации. При отсутствии сведений о ФК/ФД концентрации антибиотика тестировали концентрацию, соответствующую пограничному значению МПК для энтеробактерий (аминогликозиды, фосфомицин, хлорамфеникол) или стафилококков (рифампицин, макролиды, ванкомицин), рекомендованную EUCAST [10]. Таким образом, определяли МПК колистина в присутствии 16 антибиотиков: цефепима (8 мкг/мл), меропенема (8 мкг/мл), имипенема (8 мкг/мл), эртапенема (1 мкг/мл), дорипенема (2 мкг/мл), сульбактама (4 мкг/мл), гентамицина (4 мкг/мл), амикацина (16 мкг/мл), левофлоксацина (16 мкг/мл), фосфомицина (32 мкг/мл), тигециклина (0,5 мкг/мл), хлорамфеникола (8 мкг/мл), рифампицина (0,5 мкг/мл), азитромицина (2 мкг/мл), кларитромицина (2 мкг/мл), ванкомицина (4 мкг/мл). Фактор потенцирования (ФП) рассчитывали как отношение МПК колистина к МПК колистина в присутствии фиксированной концентрации второго антибиотика.

Определение микробиологической эффективности комбинаций антибиотиков дополнительно выполнено методом «шахматной доски» [8] в диапазоне концентраций каждого из двух антибиотиков от 1/16*МПК до 4*МПК. Заданные концентрации антибиотиков готовились в бульоне Мюллер-Хинтон и в объеме 100 мкл вносились в 64

ячейки (8x8) стерильного полистиролового 96-луночного планшета (общий объем среды в каждой ячейке – 200 мкл), после чего планшет инокулировали суспензией исследуемой культуры (конечная концентрация микробных клеток $\approx 5 \cdot 10^5$ клеток/мл) и инкубировали в течении 18 часов при 35°C в шейкере-инкубаторе с непрерывным низкоамплитудным встряхиванием. Учет результатов проводили по сравнению с контролем (рост в ячейке со средой, не содержащей антибиотиков). Рассчитывали фракционные подавляющие концентрации (ФПК) для каждого из препаратов в комбинации:

$$\text{ФПК}_A = \text{МПК}_{AB} / \text{МПК}_A$$

$$\text{ФПК}_B = \text{МПК}_{BA} / \text{МПК}_B$$

где МПК_{AB} – минимальная подавляющая концентрация препарата А в присутствии препарата В, МПК_A – минимальная подавляющая концентрация препарата А без добавления второго препарата.

Индекс ФПК ($\Sigma\text{ФПК}$) рассчитывался как сумма ФПК каждого из препаратов в комбинации:

$$\Sigma\text{ФПК} = \text{ФПК}_A + \text{ФПК}_B$$

При $\Sigma\text{ФПК} \leq 0,5$ эффект комбинации антибиотиков оценивался как синергидный, при $0,5 < \Sigma\text{ФПК} \leq 1$ – как аддитивный, при $1 < \Sigma\text{ФПК} \leq 4$ – как нейтральный.

Результаты исследования и обсуждение. Для комбинаций колистина с рифампицином и колистина с макролидами отмечен выраженный синергидный эффект, проявляющийся снижением МПК_{50} в 64-512 раз. На рисунке представлены гистограммы распределения МПК колистина и МПК колистина в присутствии рифампицина, кларитромицина и азитромицина. Эффект существенного снижения МПК колистина (в 16-2048 раз) в присутствии макролидов отмечен для всех включенных в исследование штаммов *K. pneumoniae*. МПК колистина в присутствии рифампицина снижалась в 2-128 раз, при этом у 5 штаммов (50%) – не более чем в 8 раз. Фиксированные ФК/ФД концентрации цефепима, карбапенемов, аминогликозидов, сульбактама, левофлоксацина, фосфомицина, тигециклина, хлорамфеникола и ванкомицина не оказывали значимого влияния на МПК колистина. Значения МПК_{50} и МПК_{90} колистина, определенное в присутствии этих антибиотиков, не изменялось либо снижалось не более чем в 2 раза (таблица).

Значительное снижение МПК колистина в присутствии кларитромицина отмечено и при тестировании методом «шахматной доски», значения индексов ФПК находились в диапазоне 0,023-0,094 (выраженный синергидный эффект). Для комбинации колистина с рифампицином индексы ФПК находились в диапазоне 0,031-0,188, что также свидетельствует о синергизме.

Эффект потенцирования антибактериальной активности колистина антибиотиками, к которым грамотрицательные бактерии являются природно устойчивыми, заслуживает более детального изучения в отношении различных видов энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий с множественной и экстремальной антибиотикорезистентностью. Возможным механизмом выявленных синергидных взаимодействий может быть значительное увеличение проницаемости наружной мембраны в присутствии даже небольших концентраций колистина для макролидов и рифампицина, что делает возможным их доступ к внутриклеточным мишеням. Вместе с тем, синергидный эффект не выявлен для аминогликозидов и фторхинолонов, что может быть связано как с наличием приобретенной устойчивости к ним у XDR штаммов *K. pneumoniae*, так и со специфичностью систем внутриклеточного транспорта этих антибиотиков.

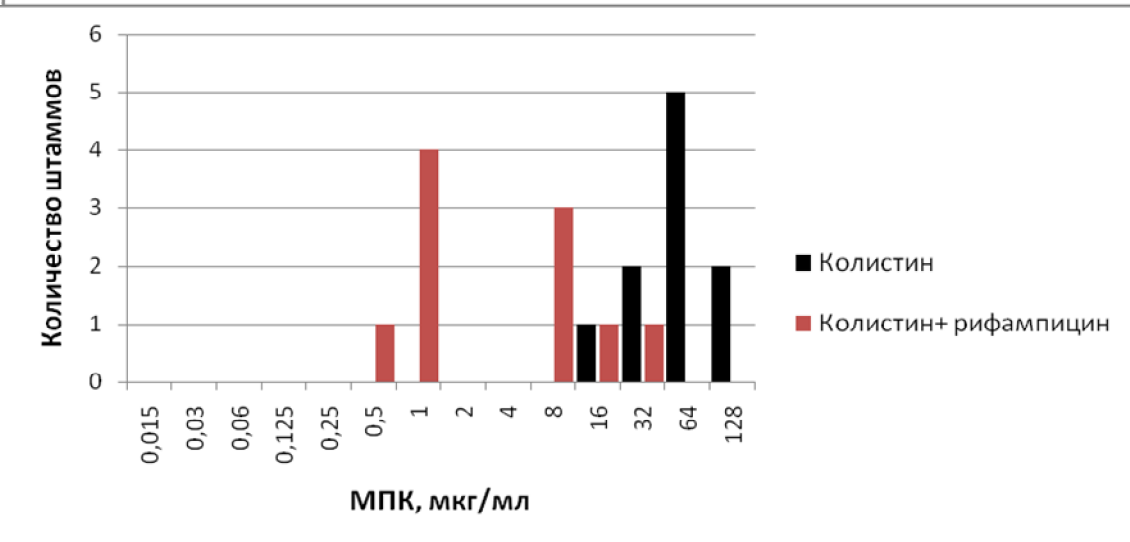
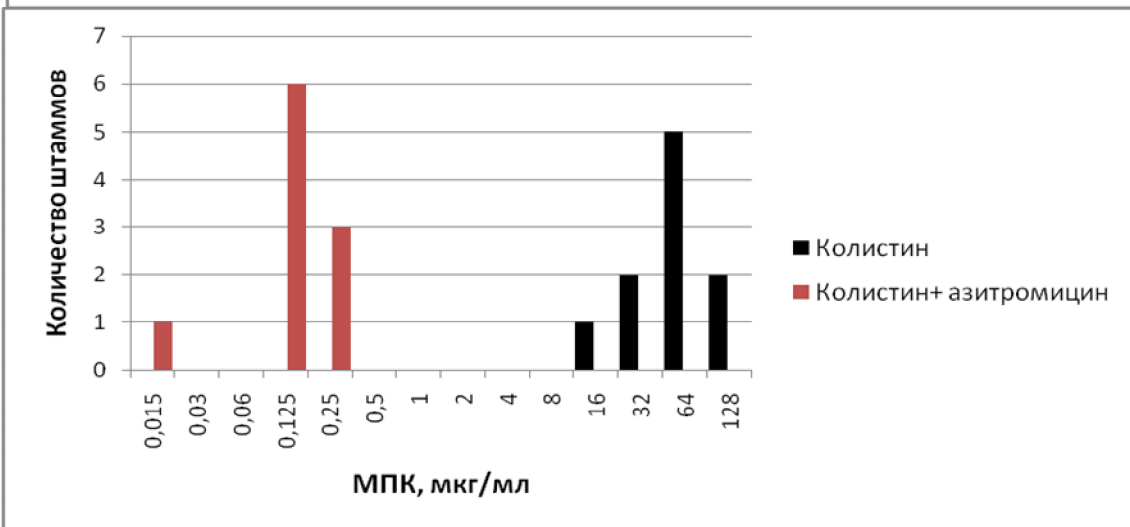
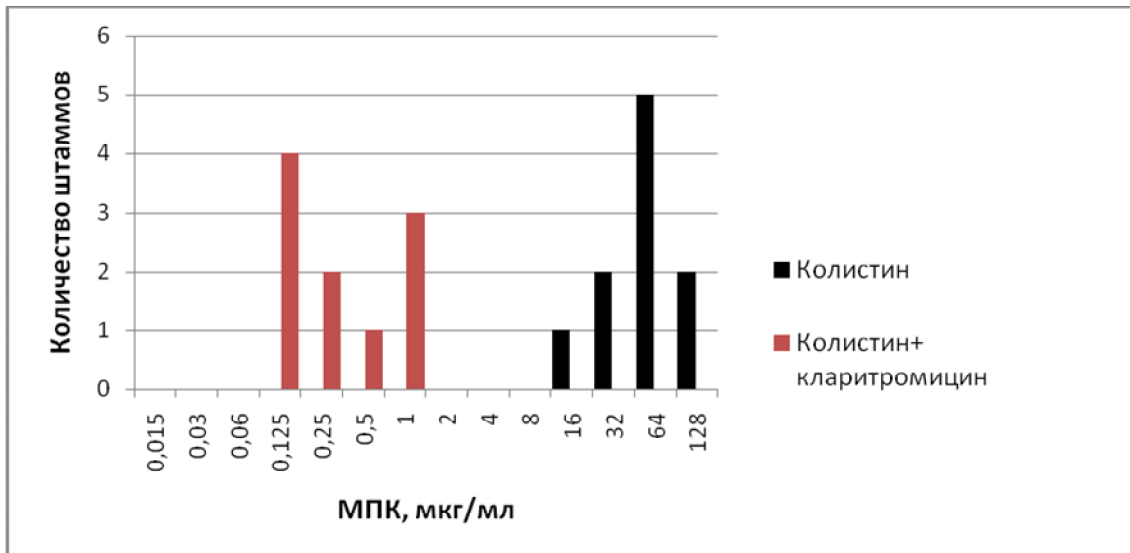


Рисунок – Распределение МПК колистина и МПК колистина в присутствии фиксированных ФК/ФД концентраций макролидов и рифампицина

Таблица. – Влияние антибиотиков разных групп на МПК колистина в отношении колистинорезистентных XDR штаммов *K. Pneumoniae*

	МПК колистина			ФП
	Диапазон МПК	МПК ₅₀	МПК ₉₀	
Колистин	16-128	64	128	-
Колистин + цефепим (8 мкг/мл)	16-128	64	128	1-2
Колистин + меропенем (8 мкг/мл)	8-128	64	128	0,5-4
Колистин + имипенем (8 мкг/мл)	0,5-128	64	64	0,5-32
Колистин + эртапенем (1 мкг/мл)	16-128	64	128	0,5-2
Колистин + дорипенем (2 мкг/мл)	16-128	32	64	1-2
Колистин + сульбактам (4 мкг/мл)	16-128	128	128	0,5-2
Колистин + гентамицин (4 мкг/мл)	16-128	64	128	1-2
Колистин + амикацин (16 мкг/мл)	16-128	64	128	1-2
Колистин + левофлоксацин (1 мкг/мл)	16-128	64	128	0,5-2
Колистин + фосфомицин (32 мкг/мл)	8-128	32	64	1-4
Колистин + тигециклин (0,5 мкг/мл)	8-128	16	64	0,5-8
Колистин + хлорамфеникол (8 мкг/мл)	16-128	64	128	0,5-2
Колистин + рифампицин (0,5 мкг/мл)	0,5-32	1	16	2-128
Колистин + азитромицин (2 мкг/мл)	0,015-0,25	0,125	0,25	64-2048
Колистин + кларитромицин (2 мкг/мл)	0,125-1	0,25	1	16-2048
Колистин + ванкомицин (4 мкг/мл)	16-128	64	128	0,5-2

Литература

1. Тапальский, Д.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции / Д.В. Тапальский, В.А. Осипов, С.В. Жаворонок // Мед. журн. – 2012. – № 2. – С. 10-15.
2. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси / Д.В. Тапальский [и др.] // Здоровоохранение. – 2017. – № 3. – С. 40-47.
3. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution / K.L. Chew [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2017. – Vol. 55. – P. 2609–2616.

4. Zavascki, A.P. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria / A.P. Zavascki, J.B. Bulitta, C.B. Landersdorfer // *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2013. – Vol. 11. – P. 1333-1353.

5. Zusman, O. Systematic review and metaanalysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems / O. Zusman // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – P. 5104–5111.

6. Activity of the colistin-rifampicin combination against colistin-resistant, carbapenemase-producing gram-negative bacteria / M. Nastro [et al.] // *J. Chemother.* – 2014. – Vol. 26. – P. 211-216.

7. Pankey, G.A. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* / G.A. Pankey, D.S. Ashcraft // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 70. – P. 561-564.

8. Potentiation of antibiotic activity by a novel cationic peptide: potency and spectrum of activity of SPR741 / D. Corbett [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2017. – Vol. 61. – e00200-17.

9. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.eucast.org>. – Date of access: 13.09.2019.

POTENTIATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COLISTIN AGAINST COLISTIN-RESISTANT STRAINS OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE BY ANTIBIOTICS OF DIFFERENT GROUPS

Tapalski D.V., Petrovskaya T.A.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

The determination of the minimum inhibitory concentrations of colistin in the presence of fixed concentrations of different antibiotics in relation to colistin-resistant carbapenemase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* was carried out. The ability of macrolides and rifampicin to significantly enhance the antimicrobial activity of colistin has been shown.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, colistin, rifampicin, macrolides.

Поступила 13.09.2019

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ФАСЦИОЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Щемелева Н.Ю., Дударчук А.Н.

Республиканское унитарное предприятие «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», Минск, Республика Беларусь

Резюме. В статье представлен материал по изучению лечебной и экономической эффективности нового комплексного препарата для терапии фасциолеза, разработанного в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Установлено, что дегельминтизация новым комплексным препаратом приводит к 100% освобождению крупного рогатого скота от фасциол и является мерой предотвращения потери молочной продуктивности у коров до 39,94%.

Ключевые слова: фасциолез, крупный рогатый скот, новые комплексные препараты, терапевтическая эффективность, экономическая эффективность.

Введение. Фасциолез (*Fascioliasis*) – гельминтозное заболевание травоядных млекопитающих и человека, возбудителем которого являются трематоды рода *Fasciola*.

По данным ВОЗ в мире насчитывается от 2,5 до 4 млн. человек больных фасциолезом. Распространение повсеместное, чаще встречается в странах с жарким и теплым климатом (Франция, Латинская Америка, Африка, Средняя Азия, Южный Казахстан) [1].

Заражение человека происходит при питье сырой воды из мелких, открытых водоемов, возле которых пасется скот, или при употреблении в пищу овощей и фруктов, вымытых такой водой. Половозрелые паразиты локализуются в желчных ходах. Известны случаи извращенной локализации – в глазу, под кожей, в слепом отростке. Фасциолез человека протекает как тяжелое заболевание. Острая миграционная фаза проявляется повышением температуры тела, высыпаниями на коже, затрудненным дыханием, болями в правом подреберье, тошнотой, рвотой, кишечными расстройствами, лейкоцитозом и выраженной эозинофилией. При хроническом течении отмечаются боли в правом подреберье, может быть анемия, кишечные и желудочные кровотечения, одышка, общее истощение, развитие цирроза печени [1].

На территории нашей республики данная инвазия распространена повсеместно, этому благоприятствует широкая озерно-речная сеть и достаточно влажный климат [2].

Ретроспективный анализ инвазированности крупного рогатого скота показывает, что в период 2005-2013 гг. уровень зараженности фасциолами варьирует. Так, в 2005-2010 гг. по отчетным данным исследований научных сотрудников отдела паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» самая низкая зараженность была в хозяйствах Минской области – 21,70%, наиболее высокая в Могилевской области – 87,70%. В 2011-2013 гг. самое низкое заражение – 14,68% – установлено в хозяйствах Гродненской области, а наиболее высокое – 74,08% – в Гомельской.

Следует отметить, что в настоящее время идет тенденция к снижению фасциолезной инвазии. В среднем по республике инвазированность крупного рогатого скота за 2018 г составила 6,34%, в том числе коров – 14,43%. Однако регистрируются отдельные хозяйства, где эти показатели достигают 50-72%. Это связано, скорее всего, со все более возрастающей резистентностью паразитов к широко применяемым антгельминтикам, и эта ситуация в целом характерна для многих стран с развитым животноводством [3, 4]. Поэтому в последнее время уделяется больше внимания разработке комплексных препаратов, имеющих определенные преимущества перед однокомпонентными средствами. Комплексные препараты имеют, как правило, более широкий спектр

действия, они более экономичны, при их использовании количество обработок животных сокращается. Нередко субстанции комплексных препаратов усиливают действие друг друга, что повышает в целом эффективность препарата, и самое важное – к поликомпонентным препаратам резистентность у паразитических организмов развивается значительно медленнее [1, 5, 6].

В отделе паразитологии ведутся научно-исследовательские работы по созданию и внедрению современных комплексных противопаразитарных препаратов, содержащих в своем составе не только субстанции, воздействующие на паразитов, но и пребиотики, витамины, аминокислоты и др.

В рамках задания «Разработать комплексный препарат широкого спектра действия для ранней терапии и профилактики трематодозов крупного рогатого скота» ГНТП «Промышленные био- и нанотехнологии» на 2016-2020 гг., был сконструирован комплексный препарат, включающий в своем составе новые субстанции, активно воздействующие на трематод, а также вещества, обладающие гепатопротективным действием.

Преимуществом нового комплексного препарата, перед существующими антгельминтиками является то, что он эффективен не только против половозрелых форм фасциол, но и молодых. Поэтому дегельминтизацию крупного рогатого скота им можно проводить раньше – при постановке животных на стойловое содержание, а не в январе – феврале, как традиционными препаратами.

Целью данной работы явилось исследование лечебной и экономической эффективности нового комплексного препарата для терапии фасциолеза.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и в КРСУП «Индустрия», Пуховичского района Минской области.

Определение яиц фасциол в пробах фекалий проводили методом последовательных смывов [7].

Всего в исследованиях было использовано 25 голов крупного рогатого скота (коровы в возрасте 3-6 лет), спонтанно инвазированных фасциолами.

Животные были сформированы в 2 опытные группы и 1 контрольную – по 10 голов и 5 голов соответственно.

1-я опытная группа была обработана комплексным препаратом в дозе 75 мг/кг живой массы с кормом, однократно, согласно временной инструкции по применению.

2-я опытная группа была дегельминтизирована препаратом «Албендатим» на основе албендазола, часто используемого в хозяйствах, в дозе 100 мг/кг живой массы с кормом, однократно.

Животные контрольной группы, спонтанно инвазированные фасциолами дегельминтизации не подвергались.

Животные находились в одинаковых условиях содержания (товарно-молочная ферма «Глушка») и кормления.

Исследования проб фекалий на выявление яиц фасциол проводили до применения препаратов и через 45 дней после их применения, согласно методических рекомендаций [8].

Экономическую эффективность применения рассчитывали по методическим указаниям по определению экономической эффективности ветеринарных мероприятий [9].

Статистическая обработка цифровых данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2010», Statistica 8.0.

Количественные показатели представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего значения ($M \pm m$). Различия между изучаемыми параметрами признавались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Исследования по изучению эффективности отечественного комплексного препарата показали значительный положительный эффект не только по противопаразитарному действию, но и сохранению молочной продуктивности коров (таблицы 1, 2).

Таблица 1. – Сравнительная эффективность нового комплексного препарата и базового «Альбендатим-100»

Препараты	Доза, мг/кг	Кол-во, гол.	Инвазированность до применения препарата, %	Инвазированность после применения препарата, %	Количество здоровых животных, гол.	Экстенсивность, %
Комплексный препарат	75,0	10	100,0	0	10*	100,0*
Альбендатим-100 (базовый препарат)	100,0	10	100,0	30,0	7	60,0
Контрольная группа (препарат не применялся)	–	5	100,0	100,0	0	–

Примечание: *Fisher exact, $p < 0,007$

Применение нового комплексного препарата приводит к существенному повышению количества выздоровевших животных на 40% выше (*Fisher exact*, $p < 0,007$). по сравнению с базовым однокомпонентным препаратом албендатимом-100. Побочных явлений при применении нового комплексного препарата не установлено. Заражение коров группы контроля оставалось на прежнем уровне.

Оценка экономической эффективности проведенной дегельминтизации проводилась по результатам молочной продуктивности (таблица 2).

Через 30 дней после применения нового комплексного препарата, удои достоверно значимо увеличились на 34,71% ($P < 0,01$) по сравнению с группой контроля 1. Через 60 дней среднесуточный удой в данной группе был достоверно выше на 39,94% ($P < 0,01$) по сравнению с группой контроля 1. Кроме этого значительно улучшилось качество молока по содержанию молочного жира и белка.

Достоверное увеличение среднесуточного удоя во второй опытной группе коров, где применяли препарат «Албендатим-100», установлено на 60 сутки исследования. Так, среднесуточный удой увеличился на 32,71% ($P < 0,01$) по сравнению с группой контроля 1.

За двух месячный период наблюдения увеличение среднего удоя после применения нового комплексного препарата составило 4,4 л, албендатима-100 – 2,3 л, в группе контроля – отмечается снижение удоев – на 1,2 л.

При расчете экономической эффективности применения животным нового комплексного препарата в расчете на рубль затрат – получено 6,28 рублей прибыли. Экономическая эффективность применения албендатима-100 в расчете на рубль затрат составила 2,63 рубля.

Исследования по изучению эффективности нового комплексного препарата и по влиянию его на продуктивность будут продолжены.

Таблица 2. – Изменение количества удоев при применении препаратов за период исследований, л

Препараты	Динамика удоев:			
	до применения препаратов	через 14 дней	через 30 дней	через 60 дней
Комплексный препарат	8,81±1,07	10,40±1,10	12,56±0,17*	13,22±0,85**
Албендатим-100	9,52±1,22	10,17±1,12	11,4±1,82	11,80±1,13*
Контроль 1 (инвазированные животные)	9,14±1,31	8,16±1,43	8,20±1,33	7,94±1,24
Контроль 2 (интактные животные, n=10)	12,24±2,08	12,86±1,24	12,72±1,16	13,09±1,57

Примечание: *P<0,01, **P<0,001 – по сравнению с группой контроля 1

Таким образом, проведение в жизнь мероприятий по контролю и лечению паразитарных болезней сельскохозяйственных животных позволяет в значительной степени сохранить их продуктивность и предупредить распространение возбудителей зоонозов в окружающей среде.

Выводы:

1. В Беларуси имеются условия для функционирования природных очагов фасциолеза, что требует проведения постоянного паразитологического мониторинга и выполнения мер борьбы с фасциолезом.

2. Применение нового комплексного препарата при фасциолезе крупного рогатого скота дало выраженный противотрематодозный и экономический эффект. Терапевтическая эффективность составила 100%, а экономическая – 6,28 рублей на рубль затрат.

3. Дегельминтизация новым комплексным препаратом является эффективной мерой предотвращения потери молочной продуктивности коров до 39,94%, а также предупреждает распространение возбудителей фасциолеза в окружающей среде.

Литература

1. Паразитарные зоонозы: монография / М.В. Якубовский [и др.]; под. ред. М.В. Якубовского. – Минск: Наша Идея, 2012. – 384 с.
2. Особенности эпизоотологии фасциолеза крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Беларусь / М.В. Якубовский [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2005. – № 4. – С. 28-34.
3. Волков, А.Х. Особенности эпизоотического процесса трематодозов и нематодозов жвачных животных за последние 25 лет / А.Х. Волков, О.Р. Еремеев // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы науч. конф., Москва, 23-25 мая 2007 г. / ВИГИС, Всерос. о-во гельминтол. – М., 2007. – С. 270-274.
4. Щемелева, Н.Ю. Фасциолез: успехи и проблемы профилактики / Н.Ю. Щемелева, М.В. Якубовский // Наше сельское хозяйство. – 2010. – № 4. – С. 35-38.
5. Багманова, Н.Н. Комплексная терапия животных при гельминтозах с использованием антигельминтиков и иммуномодуляторов: дис. ... канд. вет. наук.: 03.00.19; 16.00.03 / Н.Н. Багманова. – Самара, 2003. – 113 л.
6. Березовский, А.В. Новые аспекты тактики химиотерапии фасциолеза в условиях Украины / А.В. Березовский // Современные проблемы общей медицинской и ветеринарной паразитологии. – 2004. – № 22. – С. 345-348.
7. Котельников, Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды: справочник / Г.А. Котельников. – М.: Колос, 1984. – 208 с.

8. Фасциоз крупного рогатого скота (эпизоотология, иммунитет, иммунодиагностика и меры борьбы): метод. рекомендации: утв. Департаментом ветеринарного и продовольственного надзора М-ва сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь, 05.09.2010 № 1023/4. – Минск, 2010. – 16 с.

9. Методические указания по определению экономической эффективности ветеринарных мероприятий: утв. Главным управлением ветеринарии с Государственной ветеринарной и Государственной продовольственной инспекциями М-ва сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь 10.05.2000. – Витебск, 2001. – 38 с.

MODERN FACILITIES TO TREATMENT FASCIOLIASIS OF CATTLE

Shchemialiova N.U., Dudarchuk A.N.

S.N. Vishelevsky Research Institute for Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

The article presents material on study of therapeutic and economic efficiency of new complex drug for treatment of fascioliasis, developed in parasitology department of S.N. Vishelevsky Research Institute of Experimental Veterinary Medicine in Minsk (Belarus). It was found that deworming with new complex drug leads to 100% release of cattle from fascioliasis and measure to prevent loss of milk productivity in cows up to 39,94%.

Keywords: fascioliasis, cattle, new complex drug, therapy efficacy, economic efficiency.

Поступила 12.09.2019

АССОЦИАЦИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ 23S рРНК *HELICOBACTER PYLORI*, СВЯЗАННЫХ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К КЛАРИТРОМИЦИНУ, С ЧАСТОТОЙ ГЕНОВ ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ

¹Янович О.О., ²Дорошко М.В., ¹Титов Л.П.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Медицинский центр «Нордин», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Цель работы – выявить распространенность мутаций, связанных с резистентностью *Helicobacter pylori* к кларитромицину, и их ассоциацию с генами острова патогенности бактерии.

Полученные результаты указывают на разницу в чувствительности к кларитромицину между различными генотипами *saq-PAI H. pylori*. Более вирулентные штаммы *H. pylori* с полным набором генов острова патогенности чаще встречаются у бактерий, не обладающих резистентностью к кларитромицину, и, следовательно, более чувствительны к терапии, чем штаммы с отсутствием некоторых генов острова патогенности.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, *saq-PAI*, резистентность к кларитромицину.

Введение. *Helicobacter pylori* (*HP*) грамотрицательная, микроаэрофильная бактерия, связанная с развитием таких заболеваний как язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, хронический поверхностный гастрит, который может прогрессировать до хронического атрофического гастрита, аденокарцинома желудка.

Ключевым антибиотиком при эрадикации *HP* является кларитромицин. В 2017 г. ВОЗ определила рост резистентности *HP* к кларитромицину как высоко приоритетную

проблему [1]. Устойчивость бактерии к кларитромицину снижает успех стандартной тройной эрадикационной терапии на 70%. Основной причиной резистентности является снижение аффинности связывания антибиотика с 23S рибосомальной субъединицей бактерии из-за появления точечных мутаций в домене V (пептидилтрансферазная петля) 23S рРНК. Наиболее распространенными мутациями, связанными с устойчивостью *HP* к кларитромицину, являются A2143G, A2142G и A2142C [2].

Скорость появления устойчивости к антибиотикам в бактериальной популяции у пациента определяется несколькими факторами, включая скорость образования устойчивых мутантов, «биологическую стоимость» устойчивости, а также частоту применения антибиотиков [3].

Факторы вирулентности *HP* играют важную роль в развитии воспаления слизистой оболочки желудка и влияют на пути развития заболевания. Одним из самых изученных *HP*-детерминант вирулентности является остров патогенности (*cag*-PAI), представляющий собой кластер содержащий приблизительно 31 ген и разделенный на два региона: *cagI* и *cagII*. *Cag*-PAI кодирует белки IV секреторной системы *HP* через которую в клетки-хозяина вводится белок *CagA* [4]. Ген *cagA* расположен в самой нижней части региона *cagI* и многими исследователями считается маркером *cag*-PAI. Ген *cagE* также находится в регионе *cagI*, и его наличие необходимо для активации экспрессии интерлейкина-8 в эпителиальных клетках желудка. Ген *cagT* является маркером области *cagII*, и его белковый продукт находится у пилуса секреторной системы IV типа [4].

Целью настоящего исследования было выявление распространенности мутаций, связанных с резистентностью *H. pylori* к кларитромицину, и их ассоциация с генами острова патогенности бактерии.

Материалы и методы. Проведено обследование 136 *HP*-положительных пациентов с различной гастродуоденальной патологией (60 мужчин и 76 женщин, средний возраст $46,2 \pm 1,2$ года). Материалом для исследования служили биоптаты слизистой оболочки желудка антрального отдела, полученные во время фиброгастродуоденоскопии. Выделение ДНК проводили с использованием набора «НуклеосорбС» (Праймиех, РБ) по инструкции производителя.

Наличие *HP* в биопсийном материале подтверждено гистологическим методом и ПЦР в режиме реального времени.

Для определения генов острова патогенности *HP* (*cag*-PAI) было выполнено ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров в объеме реакционной смеси 25 мкл [5]. С целью определения резистентности *H. pylori* к кларитромицину использовали FRET-метод для выявления точечной мутации 23S рРНК [6].

Статистическая обработка данных. Для статистического анализа полученных результатов была использована компьютерная программа Statistica 8. Для установления статистической достоверности различий между группами использовались таблицы сопряженности с использованием критерия Хи-квадрат для анализа качественных признаков.

Результаты. Частота выявления генов острова патогенности *cag*-PAI. Из 136 обследованных пациентов с хеликобактериозом 98 поставлен диагноз хронический гастрит (ХГ), 38 – язва двенадцатиперстной кишки (ДПК). Частота встречаемости генов острова патогенности в обследованной группе пациентов представлена в таблице 1.

Среди образцов, полученных от пациентов с хеликобактериозом, с наибольшей частотой выявлен ген *cagA* – 59,6%. Частота обнаружения *cagL* и *cagH* составила 53,6% и 44,1%, соответственно. Гены *cagM* и *cagE* присутствовали с не высокой частотой. Ген *cagT* как маркер региона *cagII* выявлен в 55,1% образцах.

Отсутствие *cag*-PAI было детектировано в 17,6% образцах биопсий. Число пациентов имеющих полный набор генов острова патогенности *cag*-PAI (интактный *cag*-

РАI) составил 16,1%. Образцы с частично отсутствующими генами *sag*-РАI выявлены в 65,4% биопсий, наиболее часто встречающейся комбинацией была *sagA*+/*sagT*+/*sagE*-/*sagH*-/*sagL*-/*sagM*-.

Таблица 1. – Частота генов острова патогенности *H. pylori*

Гены <i>sag</i> -РАI	Всего	ХГ	Язва ДПК
<i>sagA</i>	59,6	55,1	71,1
<i>sagT</i>	55,1	49,0	71,1*
<i>sagE</i>	34,6	28,6	47,4
<i>sagM</i>	33,8	32,7	39,5
<i>sagL</i>	53,6	43,9	78,9*
<i>sagH</i>	44,1	34,7	68,4*
интактный <i>sag</i> -РАI	16,1	13,2	21,1
отсутствие <i>sag</i> -РАI	17,6	22,4	5,2
частично удаленный <i>sag</i> -РАI	65,4	64,3	73,7

Примечание: * – достоверно при сравнении с группой с хроническим гастритом, $p < 0,05$

Анализ частоты встречаемости генов *sag*-РАI в образцах у пациентов с различными воспалительными заболеваниями желудка показал, что ген *sagA* встречался с высокой частотой у пациентов с воспалительными заболеваниями желудка и ДПК: при ХГ 55,1%, при язве ДПК – 71,1%.

Выявлено достоверное увеличение частоты встречаемости гена *sagT* у пациентов с язвой ДПК по сравнению с ХГ (71,1% против 49,0% ОШ=2,5). Определено, что ген *sagL* встречался с высокой частотой у пациентов язвой ДПК – 78,9% (ОШ=4,8), что достоверно выше при сравнении с группой с ХГ ($p < 0,05$).

Частота гена *sagH* у пациентов с язвой ДПК достоверно выше при сравнении с группой пациентов с ХГ (68,4% против 34,7%, $p < 0,05$). Методом логистической регрессии установлено, что при наличии гена *sagH* увеличивается риск развития язвы ДПК (ОШ=4,1; $p < 0,001$).

Частота встречаемости гена *sagE* составила 28,6% – в группе пациентов с хроническим гастритом и 47,4% – при язве ДПК.

Установлено, что у 22,4% пациентов с ХГ отсутствуют гены острова патогенности *HP*, что достоверно выше при сравнении с группой с язвой ДПК (5,2%, $p < 0,03$) и снижает риск развития язвы ДПК в 5 раз.

Устойчивость к кларитромицину и *sag*-РАI-статус. Во всех обследованных образцах биопсийного материала было проведено определение мутаций в гене 23рННК *HP*, связанных с резистентностью к кларитромицину – А2143G, А2142G и А2142С. По данным молекулярно-генетического анализа уровень первичной резистентности *HP* к кларитромицину в обследованной группе составил 17,8%.

Распределение генов *sag*-РАI *H. pylori* по отношению к наличию мутаций, связанных с резистентностью к кларитромицину, показало, что образцы с более полным наличием генов острова патогенности чаще чувствительны к кларитромицину (таблица 2). Частота резистентности к кларитромицину *HP* составила у *sagA*+ – 50%, *sagT*+ – 45,8%, *sagH*+ – 33,3%, *sagL*+ – 41,7%.

Необходимо отметить достоверное увеличение частоты выявления генов *sagE*+ и *sagM*+ у чувствительных штаммов *HP* по сравнению с резистентными штаммами (38,4% против 12,5% и 38,4 против 16,7%, соответственно).

Процент устойчивых к кларитромицину образцов с отсутствием острова патогенности составил 29,2%. Установлено, что процент кларитромицин резистентных образцов при наличии всех генов острова патогенности был 8,3%.

Обсуждение. *H. pylori* имеет значительную генетическую гетерогенность, которая важна для колонизации и персистенции в уникальной биологической нише – слизистой оболочке желудка. Бактерия может проявлять разную патогенность и вирулент-

ность, что обусловлено ее факторами патогенности и генетическими особенностями конкретного человека и важно для клинических последствий инфекции.

Таблица 2. – Частота генов острова патогенности *HP* в зависимости от резистентности к кларитромицину

Гены	Кларитромицин чувствительные, %	Кларитромицин резистентные, %
cagA+	61,6	50
cagA-	38,4	50
cagT+	57,1	45,8
cagT-	42,8	54,2
cagM+	38,4	16,7*
cagM-	61,6	83,3
cagH+	48,2	33,3
cagH-	50	66,7
cagE+	38,4	12,5*
cagE-	61,6	87,5
cagL+	56,3	41,7
cagL-	42,9	58,3
Отсутствие sag-PAI	15,2	29,2
Интактный sag-PAI	17,0	8,3

Примечание: * – достоверно при сравнении с группой с кларитромицин чувствительными образцами, $p < 0,05$

Наиболее важной частью генома *HP* является остров патогенности (sag-PAI), гены которого имеют большую гетерогенность по сравнению с другими генетическими регионами *HP*, что вызвано более высоким давлением отбора [4].

Выявлено, что белок CagA изменяет клеточно-сигнальные механизмы в клетках желудка, индуцирует морфологические изменения, пролиферацию клеток и апоптоз, активирует секрецию интерлейкина-8, основного хемокина, вызывающего инфильтрацию нейтрофилов и воспаление в эпителиальных клетках желудка [7, 8].

За перенос белка cagA в эпителиальные клетки желудка отвечают продукты генов, входящих в состав острова патогенности sag-PAI. Установлено, что отсутствие гена CagE отрицательно влияет на транслокацию cagA, что приводит к значительному снижению секреции ИЛ-8. Цитотоксины cagE и cagH также стимулируют выработку ИЛ-8 [9]. Таким образом не только наличие CagA, но и статус остальных генов sag-PAI важен для оценки роли острова патогенности в развитии хеликобактериоза.

Частота выявления гена cagA в проведенном нами исследовании составила 59,6% (55,1% в образцах, полученных у пациентов с ХГ и 71,1% у пациентов с язвой ДПК), что согласуется с данными полученными другими исследователями [10, 11].

По литературным данным показано, что одного обнаружения cagA недостаточно для выявления статуса sagPAI [12, 13]. Наше исследование показало, что распространенность интактного sagPAI ниже по сравнению с частотой детекции только cagA. В связи с этим мы не можем использовать детекцию гена cagA для предположения о наличии остальных генов острова патогенности sagPAI.

Нами показано, что гены cagT, cagL и cagH достоверно чаще встречаются в образцах, полученных от пациентов с язвой ДПК. Необходимо отметить, что у достаточно большого числа пациентов с язвой ДПК выявлены образцы с частично отсутствующими генами sagPAI (73,4%). Можно предположить о роли других факторов вирулентности в развитии заболевания.

Успешная эрадикация *H. pylori* остается сложной задачей. Эффективность рекомендуемых методов лечения снижается в основном из-за увеличения резистентности к *HP* кларитромицину. При этом устойчивость к кларитромицину значительно варьирует в различных регионах Европы. По данным проведенного мет-анализа первичная резистентность к кларитромицину составила более 13% в странах Европы (Германия – 13%, Хорватия – 14%, Австрия – 32%, Болгария – 23%) [1]. В нашем исследовании по данным молекулярно-генетического анализа уровень первичной резистентности к кларитромицину составил 17,8%.

Многими исследователями установлена возможная связь между факторами вирулентности бактерии, резистентностью к антибиотикам и успехом эрадикации [14, 15].

Наши результаты указывают на разницу в чувствительности к кларитромицину между различными генотипами *cag*-PAI *H. pylori*. Более вирулентные штаммы *HP* с полным набором генов острова патогенности чаще встречаются у бактерий, не обладающих резистентностью к кларитромицину, и, следовательно, более чувствительны к терапии, чем штаммы с отсутствием некоторых генов острова патогенности.

Подобные результаты были получены другими исследователями в отношении сочетания генов *vac s1m1/cagA* [16, 17].

Предполагается, что отсутствие некоторых генов *cag*-PAI приводит к меньшему воспалению в эпителии желудка хозяина и может быть фактором способствующим снижению доставки антибиотиков [18]. Другое возможное объяснение, заключается в том, что вирулентные штаммы быстрее размножаются и, следовательно, более восприимчивы к антибиотикам, подавляющим деление бактерий [17].

Исходя из полученных данных можно предположить, что пациенты с устойчивыми к кларитромицину штаммами и с неполным набором генов острова патогенности имеют больший риск прогрессирования заболевания в более тяжелые состояния при неудачной эрадикации *H. pylori*.

Необходимы дополнительные исследования для оценки связи между другими факторами патогенности *HP* и наличием мутаций, связанных с устойчивостью к кларитромицину.

Литература

1. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions / A. Savoldi [et.al.] // *Gastroenterology*. – 2018. – Vol. 155, No. 5. – P. 1372-1382.
2. Nishizawa, T. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing / T. Nishizawa, H. Suzuki // *Front. Mol. Biosci.* – 2014. – Vol. 1. – P. 1-7.
3. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* / B. Björkholm [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2001. – Vol. 98, No. 25. – P. 14607-14612.
4. Backert, S. The *Helicobacter pylori* Type IV secretion system encoded by the *cag* pathogenicity island: architecture, function, and signaling / S. Backert [et al.] // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2017. – Vol. 413. – P. 187-220.
5. Янович, О.О. Распределение факторов патогенности *H. pylori* у пациентов с гастродуоденальными заболеваниями / О.О. Янович, Л.П. Титов, М.В. Дорошко // *Гепатология и гастроэнтерология*. – 2018. – Т. 2, № 2. – С. 177-181.
6. Оценка резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину методом ПЦР у больных хеликобактериозом / О.О. Янович [и др.] // *Здравоохранение*. – 2011. – № 12. – С. 9-12/
7. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island / P. Olbermann [et al.] // *PLoS Genet.* – 2010. – Vol. 6. – e1001069.

8. Tohidpour, A. CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori* / A. Tohidpour // Microb. Pathog. – 2016. – Vol. 93. – P. 44-55.
9. Merino, E. Functional interaction and structural characteristics of unique components of *Helicobacter pylori* T4SS // E. Merino, M. Flores-Encarnación, G.R. Aguilar-Gutiérrez // FEBS J. – 2017. – Vol. 21. – P. 3540-3549.
10. *Helicobacter pylori* pathogenicity and primary antimicrobial resistance in Northern Spain / M. Fernández-Reyes [et.al.] // Eur. J. Clin. Invest. – 2019. – Vol. 49, No. 8. – e13150. doi: 10.1111/eci.13150.
11. Prevalence of *H. pylori* in gastric biopsy specimen in the southeastern region of Turkey / F. Bayındır Bilman [et.al.] // J. Infect. Dev. Ctries. – 2016. – Vol. 10. – P. 1177-1182.
12. Clinical relevance of cagPAI intactness in *Helicobacter pylori* isolates from Vietnam / L.T. Nguyen [et.al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. – 2010. – Vol. 29. – P. 651-660.
13. Yadegar, A. Analysis of the intactness of *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in Iranian strains by a new PCR-based strategy and its relationship with virulence genotypes and EPIYA motifs / A. Yadegar, M. Alebouyeh, M.R. Zali // Infect. Genet. Evol. – 2015. – Vol. 35. – P. 19-26.
14. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori* / R. Francavilla [et.al.] // J. Pediatr. – 2010. – Vol. 157. – P. 228-232.
15. Change in antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea / T.J. Hwang [et.al.] // J. Clin. Gastroenterol. – 2010. – Vol. 44. – P. 536-543.
16. High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain / S. Agudo [et.al.] // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 3703-3707.
17. Sugimoto, M. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy / M. Sugimoto, Y. Yamaoka // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 2010. – Vol. 57. – P. 55-56.
18. Antibiotic resistance and cagA gene correlation: a looming crisis of *Helicobacter pylori* / A. Khan [et.al.] // World. J. Gastroenterol. – 2012. – Vol. 18. – P. 2245-2252.

ASSOCIATION OF *HELICOBACTER PYLORI* CLARITHROMYCIN RESISTANCE MUTATIONS IN GENE 23S rRNA WITH PATHOGENIC ISLAND GENES FREQUENCY

¹Yanovich O.O., ²Doroshko M.V., ¹Titov L.P.

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

²Nordin Medical Center, Minsk, Republic of Belarus

The aim of this work was to study the prevalence of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance mutations and its association to pathogenicity island genes. Our results show that the intact pathogenicity island genotype was the most prevalent among no clarithromycin resistance mutations strains, i.e. more sensitive to therapy than strains with the absence of some pathogenicity island genes.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Cag pathogenicity island, clarithromycin resistance.

Поступила 04.09.2019

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ

Ярец Ю.И., Шевченко Н.И.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

Резюме. В работе проанализирован характер динамики накопления компонентов биопленки основных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, выделяемых из хронических ран. В исследовании использован спектрофотометрический метод детекции образования биомассы и основного вещества для культур, характеризующихся выраженной продукцией биопленки. Установлено, что стафилококки обладали наиболее высокими показателями синтеза основного вещества биопленки. У штаммов *Klebsiella* регистрировались самые высокие значения биомассы. Среди неферментирующих бактерий *Pseudomonas aeruginosa* обладали более высокой способностью к синтезу основного вещества, превышающей в 1,5 раза таковую для *Acinetobacter baumannii*.

Ключевые слова: бактериальная биопленка, основное вещество биопленки, биомасса биопленки, хроническая рана, спектрофотометрическая детекция биопленки.

Введение. В настоящее время признается, что рутинное микробиологическое исследование не всегда позволяет корректно оценить этиологическую значимость бактерий, особенно при хронических инфекциях. С целью максимально эффективного воздействия на инфекционный процесс лабораторная бактериологическая диагностика все чаще дополняется методами анализа бактериальной биопленки. Необходимость этого исследования обуславливается особенностями свойств микроорганизмов, находящихся в биопленке: снижением чувствительности к антибактериальным средствам, возможностью избежать воздействия иммунной системы, различной метаболической активностью клеток в биопленке. Бактериальная биопленка, способна глубоко проникать в ткани, индуцируя хроническое воспаление, что приводит к прогрессирующему или осложненному течению заболевания [1].

Основными компонентами биопленки, которые анализируются при микробиологическом исследовании, являются бактериальная биомасса и основное вещество или экзополисахаридный матрикс (ЭПМ). Последний синтезируется самими бактериями после их адгезии к поверхности, и является барьером, который защищает микроорганизмы от внешних воздействий [2]. Анализ накопления биомассы и основного вещества наиболее важен, так как установлено, что степень адгезии, способность к пленкообразованию, коррелирует со степенью вирулентности бактерии [3]. Спектрофотометрический метод является распространенным способом детекции образования биомассы и ЭПМ биопленки, что определяется возможностью широкого использования в практике работы микробиологических лабораторий.

Доказано, что хронические раны являются типичной патологией, ассоциированной с биопленкой. Достаточное количество публикаций доказывают трансформацию бактерий из планктонной формы в биопленку и ее первостепенную роль в задержке раневого заживления. Наличие в хронической ране нежизнеспособных тканей служит хорошей питательной средой для бактерий, что поддерживает уровень колонизации раны, способствует образованию биопленки и ее сохранению [4, 5]. Присутствие полимикробной флоры является отличительной особенностью хронической раны [6]. Формирование выраженной биопленки сопровождается слабо выраженным воспалительным ответом, нарушением миграции клеток и роста грануляционной ткани.

Продемонстрирован эффект синергизма различных видов бактерий в полимикробной биопленке, предопределяющий вирулентность и патогенетический эффект в хронизации раневого процесса [4, 6]. В связи с этим актуальным является характеристика динамики образования биопленки основными представителями грамположительной и грамотрицательной микрофлоры хронической раны. Полученные данные позволят определить принципиально важных для раневого процесса бактерий-продуцентов биопленки.

Цель: оценить характер динамики накопления основного вещества и биомассы бактериями-продуцентами биопленки с учетом их тинкториальных свойств.

Материалы и методы. В качестве объекта для оценки динамики биопленкообразования определены культуры бактерий, полученные из хронических ран пациентов (давность существования ран от 4-х недель и более). Бактерии выделялись из раневого отделяемого в процессе стандартного микробиологического анализа, выполняемого на базе клинических лабораторий ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Способность формировать биопленку определяли по ранее разработанной и внедренной в работу лабораторий методике (патент Республики Беларусь № 20326) [7]. Для анализа использовали суточную культуру бактерий в планктонной фазе, суспензированную в 5 мл жидкого триптиказо-соевого бульона, содержащего 0,25% глюкозы ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл или 0,5 по McFarland). Полученную суспензию бактерий разделяли на 2 одинаковые части. Суспензию бактерий из первой части инокулировали в лунку стерильного плоскодонного пластикового иммунологического планшета в количестве по 100 мкл. Во вторую часть суспензии добавляли 50 мкл 0,1% водного раствора Конго красного и инокулировали во вторую лунку этого же пластикового планшета в количестве 100 мкл. Оценку формирования биопленки проводили в динамике, результаты снимали через 2, 4, 6, 18, 24, 48 ч инкубации в оптимальных для роста бактерий температурных условиях. После окончания каждого срока инкубации планктонные клетки из обеих лунок удаляли пипетированием, лунки планшета 3-хкратно промывали 10 мМ фосфатным буферным раствором (pH 7,2). В первую лунку для детекции накопления биомассы биопленки добавляли 50 мкл 0,1% раствора генцианвиолета и оставляли при комнатной температуре в течение 10 мин для окраски. Через 10 мин несвязавшийся краситель из первой лунки удаляли путем однократной отмычки 10 мМ фосфатным буфером. Затем в первую лунку добавляли 200 мкл 95% этанола для экстракции связавшегося с биомассой биопленки красителя. Во вторую лунку также вносили 200 мкл 95% этанола для экстракции связавшегося с ЭПМ красителя Конго красного в процессе инкубации. 125 мкл раствора генцианвиолет/этанол из первой лунки и 125 мкл раствора Конго красный/этанол из второй лунки переносили в оптически чистые лунки. Количественную оценку полученных спиртовых экстрактов осуществляли на микропланшетном спектрофотометре (Sirio, Seac Radium Group, Италия). Определение оптической плотности элюатов генцианвиолет/этанол и Конго красный/этанол осуществляли при длине волны 540 и 490 нм, соответственно. Результат выражали в единицах оптической плотности (OD). Контролем служили лунки, в которые добавляли только жидкую питательную среду без бактерий. Интерпретацию результатов анализа продукции биопленки выполняли по ранее разработанной методике (таблица) [8].

В исследование включали представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, у которых с помощью спектрофотометрического метода устанавливали способность к формированию биопленки. За выраженных продуцентов биопленки принимали тех бактерий, для которых оптическая плотность спиртового экстракта Конго красного превышала 0,460 ед. (т.е. более $4 \times OD_k$) в сроки инкубации 18 и 24 ч. Характер динамики накопления биомассы и основного вещества оценили у 30

штаммов *Staphylococcus spp.* (из них 20 *S. aureus*), 25 штаммов *Enterococcus faecalis*, 21 штамм из рода *Klebsiella* (17 *K. pneumoniae*, 4 *K. oxytoca*), 21 штамм *Proteus mirabilis*, 30 представителей рода *Pseudomonas* (*Ps. aeruginosa*), 25 штаммов *Acinetobacter* (*A. baumannii*).

Таблица. – Интерпретация результатов определения оптической плотности

Значение оптической плотности	Накопление основного вещества биопленки	Образование биомассы биопленки
$\leq OD_k$	отсутствует	отсутствует
$OD_k < OD_0 \leq 2 \times OD_k$	низкая	низкая
$2 \times OD_k < OD_0 \leq 4 \times OD_k$	умеренная	умеренная
$> 4 \times OD_k$	выраженная	выраженная

Примечания:

1. OD_k – оптическая плотность контроля (№ 1 и № 2).
2. OD_0 – оптическая плотность исследуемого (опытного) образца.
3. Для экстрактов генцианвиолет/этанол, используемых для оценки биомассы биопленки, OD_k рассчитывают по формуле: $OD_k = OD_{\text{контроля №1}} + 3 \times SD_{\text{контроля №1}}$, где SD – стандартное отклонение.
4. Для экстрактов Конго красного/этанол, используемых для оценки основного вещества биопленки, OD_k рассчитывают по формуле: $OD_k = OD_{\text{контроля №2}} + 3 \times SD_{\text{контроля №2}}$.

Результаты исследования подвергали статистической обработке, применяли непараметрические методы статистики. Характеристики распределения для оптимального представления о центральной тенденции, ширине и асимметрии результатов выражали в виде медианы и 25 и 75 квартилей: Me (25%; 75%). Анализ различий по количественным показателям во взаимосвязанных выборках проводили с использованием W -критерия Вилкоксона, в независимых выборках – с помощью рангового U -критерия Манн-Уитни. Определение различий в независимых группах проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса. При нахождении значимых различий, проводили парные сравнения для установления факта, какие из независимых групп отличаются друг от друга. С этой целью применяли критерий Шеффе в рамках одномерного дисперсионного анализа. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. На рисунке (А-Е) представлена динамика оптической плотности этанольных экстрактов Конго красного и генцианвиолета для грамположительных и грамотрицательных бактерий, характеризующихся выраженной способностью формировать биопленку. Общей характеристикой изменений являлось постепенное нарастание OD экстракта Конго красного, отражающего накопление основного вещества биопленки, с достижением максимума через 24 ч инкубации, и снижением показателя через 48 ч исследования (значимость по тесту Вилкоксона $p < 0,01$). Исключение составили штаммы *Proteus mirabilis*, для которых величины OD к 48 ч инкубации оставались на уровне значений 24 ч (рисунок Г). Среди анализируемых грамположительных бактерий у стафилококков регистрировалась наиболее высокая способность к накоплению основного вещества биопленки: уже через 4 ч у 73 % штаммов ($n=22$) определялась OD элюата Конго красного, превышающая 0,460 ед. К 18 и 24 ч все стафилококки имели сформированную биопленку, при этом величины абсорбции были наиболее значительными среди всех видов бактерий (значимость по тесту Шеффе $p < 0,001$), составляя 1,365 (1,07; 1,622) ед. (рисунок А). При этом OD элюата генцианвиолета были ниже значений OD раствора Конго красного в сроки исследования от 4 до 48 ч ($p < 0,01$). Это говорит о том, что при выраженной способности формировать биопленку стафилококки более активно

образуют защитный ЭПМ, чем накапливают клеточную массу. Представители рода *Staphylococcus spp.*, обладают высоким колонизационным потенциалом и выживаемостью за счет наличия широкого спектра факторов колонизации, адгезинов, прочной клеточной стенки, факторов персистенции [9]. Высокая интенсивность накопления основного вещества, может объяснять высокий уровень антагонистической активности стафилококков, а также причину преобладания стафилококков в составе бактериальных ассоциаций.

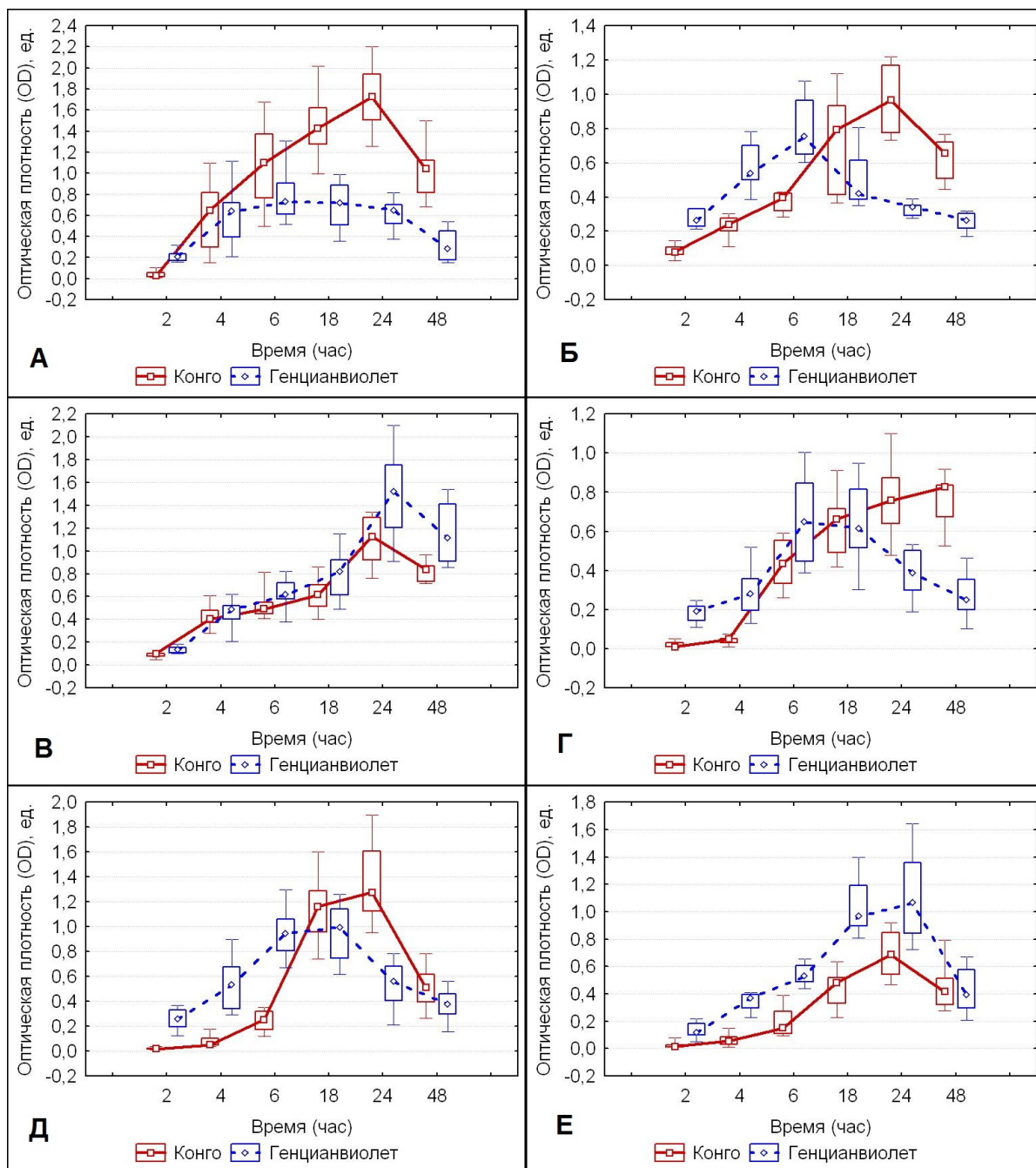
Другие грамположительные бактерии – *E. faecalis*, формировали биопленку в более поздние сроки – начиная с 6 ч инкубации, интенсивность накопления основного вещества достигала величин, определяющих выраженную биопленку не ранее, чем через 24 ч инкубации, составляя 0,964 (0,777; 1,167) ед. Из рисунка Б видно, что в сроки от 2 до 6 ч инкубации у *E. faecalis* происходила наиболее активная адгезия и пролиферация, после чего биомасса снижалась и к 48 ч достигала минимума значений OD. Несмотря на то, что энтерококки являются представителями нормальной микрофлоры, они обладают высокой адгезивной способностью, продуцируют воспалительные белки и токсины, что обуславливает их вирулентность и клиническую значимость [10].

Среди грамотрицательных энтеробактерий наиболее интенсивно и в более ранние сроки образовывали биопленку штаммы *Klebsiella*. К особенностям ее образования можно отнести одновременное постепенное нарастание значений OD элюатов Конго красный/этанол и генцианвиолет/этанол, что отличало динамику образования биопленки *Klebsiella* от таковой у стафилококков. К 24 ч во всех случаях у *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* показатели синтеза основного вещества превышал 0,460 ед., составляя 1,125 (0,919; 1,29) ед. (рисунок В). Необходимо отметить, что через 24 ч инкубации у *Klebsiella* регистрировались самые высокие среди всех анализируемых бактерий значения биомассы – показатели абсорбции экстракта генцианвиолет/этанол составляли 1,520 (1,205; 1,750) ед. (значимость по тесту Шеффе $p < 0,001$).

Как уже указывалось выше, у штаммов *Proteus mirabilis* значения OD экстракта Конго красного на 48 ч инкубации сохранялись высокими – на уровне 0,827 (0,547; 0,837) ед. Однако уровень накопления биомассы биопленки через 48 ч снижался, приближаясь к значениям начальных сроков инкубации, и составлял 0,249 (0,200; 0,355) ед. (значимость по тесту Вилкоксона $p < 0,01$). Сохранение способности синтезировать основное вещество биопленки на поздних сроках инкубации даже при низких значениях биомассы можно рассматривать как отличительное свойство *Proteus mirabilis*.

Необходимо отметить, что грамотрицательные энтеробактерии, как *Klebsiella*, так и *Pr. mirabilis*, проявляли выраженную продукцию основного вещества биопленки в более ранние сроки, чем грамотрицательные неферментирующие бактерии – *Ps. aeruginosa*, *A. baumannii*. Через 6 ч инкубации OD спиртового элюата Конго красного у *Klebsiella* 0,493 (0,449; 0,550) ед. (значимость по тесту Шеффе $p = 0,042$; $p = 0,018$, относительно значений *Ps. aeruginosa*, *A. baumannii*, соответственно). У *Pr. mirabilis* показатель составил 0,436 (0,335; 0,555) (значимость по тесту Шеффе $p = 0,028$; $p = 0,04$, относительно значений *Ps. aeruginosa*, *A. baumannii*, соответственно).

При сравнении спектрофотометрических показателей образования биопленки у грамотрицательных неферментирующих бактерий установлена одинаковая направленность динамики показателей абсорбции экстрактов генцианвиолета и Конго красного (рисунок Д и Е). Однако детальный анализ показал, что *Ps. aeruginosa* обладает более высокой способностью к синтезу основного вещества, превышающей в 1,5 раза таковую для *A. baumannii* через 18 и 24 ч инкубации (значимость по тесту Манн-Уитни $Z = 3,9$; $p < 0,001$).



А, Б, В, Г, Д, Е – представлена динамика изменения оптической плотности этанольных экстрактов Конго красного и генцианвиолета для *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *Ps. aeruginosa*, *Acinetobacter* соответственно

Рисунок. – Динамика изменения оптической плотности растворов Конго красный/этанол и генцианвиолет/этанол для штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, обладающих выраженной продукцией биопленки

Для *A. baumannii* было характерно более интенсивное накопление биомассы биопленки, чем основного вещества (рисунок Е), через 24 ч значения OD элюата генцианвиолета превышали таковые для *Ps. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, *Staphylococcus spp.*, *E. faecalis* (значимость по тесту Шеффе, $p < 0,001$), уступая только показателям *Klebsiella*. Неферментирующие бактерии – *Pseudomonas*, *Acinetobacter* являются вторыми по частоте встречаемости представителем микрофлоры хронических ран, при этом в острых

ранах они обнаруживаются редко, что объясняют биопленкообразованием и нарушением местных иммунных реакций [4, 6].

Выводы:

1. Выраженные продуценты биопленки, выделенные из хронических ран, характеризовались постепенным накоплением основного вещества с достижением максимума через 24 ч инкубации (значимость по тесту Вилкоксона $p < 0,01$).

2. Стафилококки образовывали основное вещество биопленки через 18-24 ч, при этом при этом величины абсорбции были наиболее значительными среди всех видов бактерий (значимость по тесту Шеффе $p < 0,001$).

3. К особенностям продукции биопленки штаммами *Klebsiella* относилось одновременное постепенное нарастание значений оптической плотности, определяющих синтез биомассы и ЭПМ. Через 24 ч инкубации у *Klebsiella* регистрировались самые высокие значения биомассы (значимость по тесту Шеффе $p < 0,001$).

4. Среди неферментирующих бактерий *Ps. aeruginosa* обладали более высокой способностью к синтезу основного вещества, превышающей в 1,5 раза таковую для *A. baumannii* через 18 и 24 ч инкубации (значимость по тесту Манн-Уитни $Z=3,9$; $p < 0,001$). Для *A. baumannii* было характерно более интенсивное накопление биомассы биопленки, чем основного вещества, через 24 ч спектрофотометрические показатели превышали таковые для *Ps. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, *Staphylococcus spp.*, *E. faecalis* (значимость по тесту Шеффе, $p < 0,001$).

Исследование выполнено в рамках НИР БРФФИ «Жизнеспособность и функциональная активность фибробластов при взаимодействии с матриксом бактериальных биопленок» (договор № М19-007 от 02.05.2019), № госрегистрации 20191399 от 19.06.2019.

Литература

1. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections / D. Lebeaux [et al.] // Pathogens. – 2013. – Vol. 2. – P. 288-356.

2. Wolcott, R. The role of biofilms: are we hitting the right target? Current concepts in wound healing: update 2011 / R. Wolcott, S. Down // Plast. Reconstr. Surg. – 2011. – Vol. 127, suppl. 1. – P. 28S-37S.

3. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices / G.D. Christensen [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1985. – Vol. 22, No. 6. – P. 996-1006.

4. Mistic, A.M. The wound microbiome: modern approaches to examining the role of microorganisms in impaired chronic wound healing advances in wound care / A.M. Mistic, S.E. Gardner, E.A. Grice // Adv. Wound Care. – 2014. – Vol. 7, No. 3. – P. 502-510.

5. Percival, S.L. Biofilms and wounds: an overview of the evidence / S.L. Percival, S.M. McCarty, B. Lipsky // Adv. Wound Care. – 2015. – Vol. 4, No. 7. – P. 373-381.

6. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis / T. Bjarnsholt [et al.] // Wound Repair Regen. – 2008. – Vol. 16. – P. 2-10.

7. Способ оценки способности бактерий формировать биопленку: пат. ВУ 20326 / Ю.И. Ярец, Н.И. Шевченко, И.А. Новикова. – Оpubл. 30.08.2016.

8. Рожко, А.В. Метод микробиологической диагностики посттравматической раневой инфекции: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 30.06.2016 / А.В. Рожко, Ю.И. Ярец, Н.И. Шевченко. – Гомель, 2015. – С. 4-7.

9. Семенов, А.В. Характеристика антагонистической активности *Staphylococcus aureus* при межмикробных взаимодействиях / А.В. Семенов // Вест. Томск. гос. ун-та. Биология. – 2011. – Т. 15, Тщ 3. – С. 56-66.

10. Габриэлян, Н.И. Факторы риска и нозокомиальные инфекции, вызываемые энтерококками / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горска, О.М. Цирульникова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. XVII, № 2. – С. 64-69.

EVALUATION OF THE DYNAMICS OF THE FORMATION OF A BIOFILM BY GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA USING SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION

Yarets Y., Shevchenko N.

*Republican Scientific Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel,
Republic of Belarus*

The nature of the dynamics of the accumulation of biofilm components of the main representatives of gram-positive and gram-negative bacteria isolated from chronic wounds was analyzed. The study used a spectrophotometric method for detecting the formation of biomass and the main substance for bacterial cultures characterized by pronounced biofilm production. It was found that staphylococci had the highest rates of biofilm slime production. Klebsiella strains recorded the highest biomass values. Among non-fermenting bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* had a higher ability to slime production, exceeding 1.5 times that of *Acinetobacter baumannii*.

Keywords: bacterial biofilm, biofilm slime, biofilm biomass, chronic wound, spectrophotometric biofilm detection.

Поступила 16.09.2019

Оригинальные исследования

СТРАТЕГИИ ИЗЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ: ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ И ТРУДНОСТИ ИХ РЕАЛИЗАЦИИ

Бобкова М.Р.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

Резюме. Обзорная статья посвящена актуальной теме эрадикации и функционального излечения ВИЧ-инфекции. В сжатой форме рассматриваются вопросы, касающиеся истории открытия, характеристик и происхождения основных резервуаров ВИЧ, теоретические подходы к их ликвидации, примеры клинического излечения ВИЧ-инфекции и принципиальные направления разработки средств, способных производить направленное уничтожение латентно инфицированных клеток. Очерчен круг методологических подходов к измерению объема резервуаров, охарактеризованы их достоинства и недостатки. Описан порядок проведения клинических испытаний средств эрадикации ВИЧ, включающих период аналитического прерывания антиретровирусной терапии.

Ключевые слова: ВИЧ, антиретровирусная терапия, резервуар, эрадикация, функциональное излечение.

Антиретровирусная терапия (АРТ) произвела революцию в жизни людей, живущих с ВИЧ. Благодаря применению средств АРТ при условии высокой приверженности к лечению и отсутствия побочных эффектов продолжительность жизни инфицированных людей теоретически может сравняться с таковой у людей, не инфицированных ВИЧ.

Тем не менее, АРТ не способна полностью избавить организм человека от вируса, и лечение должно быть пожизненным: стоит его прекратить, и вирус восстанавливается в течение нескольких недель у всех зараженных индивидуумов даже после многих лет супрессивной терапии [1]. Применение высокочувствительных молекулярных методов позволило установить, что в отсутствие определяемого стандартными методами уровня вирусной нагрузки некоторое количество ВИЧ, исчисляемое единичными копиями РНК/мл, всегда присутствует даже у самых успешных пациентов, составляя основу так называемой «остаточной виремии» [2-4].

Объяснений этому могло быть два: либо вирус продолжает размножаться на низком уровне, вступая в циклы репликации в чувствительных клетках и заражая все новые и новые мишени, либо репликации отсутствует, однако ВИЧ сохраняется в нереплицируемой форме в неких резервуарах, откуда время от времени поступает в кровь. Поиск таких резервуаров и разработка методов их уничтожения составили и продолжают составлять значительную часть современных исследований ВИЧ-инфекции [5].

На ранних этапах этих исследований поиск был сосредоточен на попытках интенсификации АРТ, когда надежды возлагались на усиление ингибирования репликации ВИЧ путем повышения интенсивности лекарственного воздействия. С этой целью были апробированы несколько способов, включая повышение дозировки препаратов, увеличение их числа в схеме до четырех-пяти, применение новых экспериментальных препаратов и др. Такая стратегия приводила к некоторому дополнительному снижению вирусной нагрузки, однако оно было незначительным, и полного ингибирования добиться не удавалось. Результаты интенсификации терапии склонили мнение исследователей в пользу мысли о существовании резервуаров [6].

К настоящему времени эта мысль оформилась в утверждение о существовании двух принципиально различающихся видов резервуаров – анатомических и клеточных [7].

Под анатомическими резервуарами (санктуариями) понимают ткани или анатомические зоны, в которых концентрация лекарственных препаратов может не достигать значений, достаточных для подавления размножения ВИЧ, в силу недостаточной тканевой проницаемости либо существования барьеров [8]. Наиболее типичными и относительно хорошо изученными санктуариями являются лимфоузлы и центральная нервная система (ЦНС) [9].

В лимфоузлы с периферии поступают дендритные клетки, «нагруженные» вирусными частицами. В условиях пониженной проницаемости для препаратов АРТ, характерной для лимфоузлов, вирус заражает наивные клетки, которые находятся в этой зоне. Кроме того, в этой же зоне, характеризующейся большой концентрацией иммунных клеток – мишеней для ВИЧ, вирус активно использует механизм заражения «клетка-клетка», когда вирусные частицы передаются через мембрану непосредственно в контакте клеток, не требуя взаимодействия с рецепторами. Такой способ передачи вируса приблизительно в 1000 раз эффективнее, чем заражение вируса клеток обычным способом. Наконец, здесь же присутствуют резидентные фолликулярные Т-клетки, которые никогда не покидают пределов лимфоузла и, став инфицированными, остаются недостижимыми для лекарственной терапии.

В ЦНС основной преградой для проникновения лекарств является гемато-энцефалический барьер, который одновременно с этим препятствует попаданию в ткани мозга иммунных клеток, в том числе цитотоксических, делая ЦНС иммунопривилегированной зоной. Дополнительным осложнением становится присутствие в ЦНС как минимум двух видов клеток, способных стать мишенями для ВИЧ – макрофагов и микроглии и составить часть так называемого клеточного резервуара, причем именно микроглиальные клетки считаются его наиболее долгоживущей частью.

Происхождение клеточных резервуаров остается понятным не до конца, но лидирующая концепция представляет себе этот феномен следующим образом [10]. Активированные Т-клетки, включая хелперные CD4+, после завершения выполнения своей основной функции переходят в большинстве к стадии апоптоза, и лишь небольшая их часть не погибает, а составляет основу будущего пула клеток памяти. Эти клетки характеризуются пониженным уровнем внутриклеточной активности, в них почти не происходят процессы транскрипции и трансляции, поэтому такое состояние клетки принято называть «покоящимся».

Если в момент перехода активированной клетки в «покоящееся» состояние произойдет событие заражения ВИЧ, может создаться ситуация, когда геном ВИЧ уже будет встроен в хромосому, но последующие этапы репликации вируса будут блокированы, поэтому лекарственная терапия в отношении таких клеток неэффективна. Поскольку покоящаяся клетка не производит антигенов ВИЧ, она одновременно с АРТ становится неуязвимой и для иммунной системы.

Такую клетку, содержащую провирусную ДНК ВИЧ, но не производящую вирусного потомства, называют латентно инфицированной, и именно такие клетки, как выяснилось, составляют большую часть резервуара ВИЧ [11].

Особенностью клеток памяти является их способность к размножению простым митотическим делением, благодаря чему пул клеток памяти поддерживается в течение всей жизни человека. Время от времени латентно инфицированные клетки реактивируются под действием самых разных причин – химического воздействия, облучения ультрафиолетовыми или рентгеновскими лучами, наличие инфекционных процессов в организме – и переходят в активное состояние, сопровождающееся продукцией вирусных частиц ВИЧ; именно они поддерживают «остаточную вирусность».

Итак, интеграция генома ВИЧ в долгоживущие покоящиеся клетки - латентность ВИЧ является главным барьером для лечения. Современные исследования преодоления этого барьера сосредоточены на двух направлениях – эрадикации и функционального излечения [10, 12-14].

Эрадикация ВИЧ (стерилизующее излечение) предполагает полную ликвидацию всей популяции вируса в организме инфицированного человека, включая РНК вирусных частиц и провирусную ДНК в клетках. Функциональное излечение допускает незначительное присутствие ВИЧ в организме (например, несколько копий РНК/мл крови), при этом предполагается, что после специального краткосрочного терапевтического воздействия иммунная система полностью восстанавливается, а лечение в течение последующей жизни уже не нужно. Практически все разрабатываемые в настоящее время подходы к уничтожению резервуаров включают обе стратегии, и разделить их довольно трудно.

Примеров полной эрадикации ВИЧ в организме человека пока очень немного, и все они связаны с применением трансплантации стволовых клеток, имеющих генетический дефект – делецию в гене CCR5, кодирующем корецептор, обеспечивающий проникновение вируса в клетку. У гомозигот по этой делеции ($\Delta 32$ CCR5) образующийся корецептор не может контактировать с вирусным белком gp120, в результате чего заражение становится невозможным; такие люди практически не подвержены риску инфицирования ВИЧ.

Первый случай трансплантации стволовых клеток $\Delta 32$ произошел в 2007 году [15] в Берлине, когда пациенту, в течение многих лет получавшему АРТ, понадобилось лечение острого миелогенного лейкоза, не поддававшегося стандартным схемам химиотерапии. Состояние пациента не допускало продолжения применения АРТ, поэтому ему отменили противовирусную терапию и последовательно провели полное облучение организма (для уничтожения собственных иммунных клеток), трансплантацию и обширный курс химиотерапии. После этого тяжелого лечения через год после рецидива лейкоза потребовалась повторное переливание стволовых клеток от того же донора, и с тех пор у «берлинского пациента», излечившегося от лейкоза, не находят следов присутствия ВИЧ в организме [16].

В 2019 году было объявлено еще о двух случаях успешной эрадикации ВИЧ, достигнутой у пациентов в Лондоне [17] и Дюссельдорфе. Эти случаи были связаны с хож-дкинской лимфомой и сопровождались лишь частичным курсом химиотерапии, однако результат применения такого «щадящего» подхода также оказался положительным.

Инициатива трансплантации $\Delta 32$ стволовых клеток в настоящее время поддержана международным проектом ICISTEM, в рамках которого создается банк стволовых клеток – как $\Delta 32$, так и клеток «дикого» и гетерозиготных вариантов. В 2019 году было осуществлено 39 процедур пересадки клеток у пациентов, оказавшихся в сходной с «берлинским», «лондонским» и «дюссельдорфским» пациентами ситуации, результатов следует ожидать через несколько месяцев.

Описанный подход, очевидно, нельзя будет применить для излечения всех ВИЧ-инфицированных людей. Ситуации, в которых он был использован, связаны были со спасением только очень тяжелых пациентов; процедуры трансплантации требуют тщательного подбора стволовых клеток, которые должны соответствовать всем критериям совместимости и которых нельзя будет подобрать для всех. Тем не менее, важность этого достижения трудно переоценить, поскольку он продемонстрировал принципиальную возможность полного уничтожения ВИЧ в организме человека, а это дает надежду на дальнейший успех.

Одна из испытываемых стратегий включает в себя генно-терапевтические манипуляции, приводящие к «вырезанию» части гена CCR5 и превращению обычных клеток в клетки, аналогичные трансплантированным $\Delta 32$ [13]. Такие исследования уже прово-

дятся в лабораториях, а в 2019 году пришли даже сообщения о манипуляциях над человеческими эмбрионами [18, 19], неоднозначно воспринятые мировым научным сообществом.

Другие стратегии рассматривают несколько терапевтических подходов для контроля или ликвидации клеточного резервуара ВИЧ [20]. Направлений здесь несколько: максимально раннее начало лечения [21], полное уничтожение всех клеток, несущих провирусную ДНК ВИЧ, ограничение транскрипции в латентно инфицированных клетках [22] и др. [23].

Одно из наиболее перспективных направления получило название «kick-and-kill» и заключается в том, чтобы индуцировать (активировать) все латентные клетки для того, чтобы превратить их в мишени АРТ [24, 25].

Более детально, небольшие молекулы, которые активируют транскрипцию ВИЧ, будут использоваться для форсирования реактивации латентного ВИЧ в CD4 + Т-клетках памяти «под прикрытием» АРТ. Впоследствии реактивация экспрессии ВИЧ будет вызывать цитопатические эффекты, иммунный клиренс и гибель всех инфицированных клеток, включая латентно инфицированные клетки, тогда как неинфицированные клетки будут защищены АРТ.

Одна из сложностей такого подхода заключается в том, что активация клеток должна быть сугубо избирательной, ведь неспецифическая активация всех клеток памяти неминуемо приведет к их апоптозу, развитию системного воспаления и гибели иммунной системы.

На пути реализации этой идеи есть и другие проблемы, связанные с отсутствием возможности одновременно реактивировать все без исключения латентные клетки – а ведь именно в этом заключается смысл процедуры. Многие из неактивированных провирусов могут оказаться вполне компетентны в отношении репликации, а скрытый резервуар может быть многократно больше, чем предполагалось ранее. Кроме того, пока отсутствуют доказательства того, что лимфоциты, в которых ВИЧ реактивируется, полностью удаляются из латентного пула.

В связи с разработками указанных выше проблем возникла еще одна, связанная с методологией оценки объема резервуаров, поскольку для слежения за эффектом стерилизующей терапии необходим инструмент количественного анализа. Истинным резервуаром считаются клетки, содержащие в своем составе так называемые репликативно-компетентные провирусы и способные дать после реактивации полноценное вирусное потомство. Для измерения этого показателя применяются две группы методов – культуральные и молекулярные [26].

Культуральные методы обычно включают в себя процедуры выделения пула клеток памяти, их культивирование и последующую активацию с применением самых разнообразных агентов; после этого производится оценка количества продуцируемых вирусных частиц и расчет числа клеток, которые их произвели [27]. Такие методы, как правило, существенно занижают число репликативно-компетентных клеток по причине того, что активация носит неспецифический характер, а эффективность активации недостаточна для того, чтобы индуцировать транскрипцию в всех таких клетках.

Молекулярные методы обладают прямо противоположным недостатком, поскольку не могут оценить компетентность клеток в отношении репликации, вместо этого измеряя количество общей ДНК либо внутриклеточную фракцию индуцированной РНК [28], что также не полностью отражает события, происходящие в клетках, и не учитывает состояния и наличия дефектов провируса. Таким образом, результаты, полученные молекулярными методами, обычно сильно завышены по отношению к истинному объему резервуара [29].

Точного метода измерения клеточных резервуаров на данный момент не существует, и разница между результатами, полученными с применением двух подходов, составляет два-три порядка [30, 31]. В разработке находятся комбинированные подходы, и

постепенно, по-видимому, удастся прийти к объективному методу, который позволит сравнивать между собой результаты разных исследований, но пока в каждом из таких исследований авторы чаще всего разрабатывают собственный метод, который считают наиболее точным и который позволяет им наблюдать за изменениями объема резервуаров ВИЧ в динамике.

Клинически исследования терапевтических агентов, направленных на функциональное излечение ВИЧ-инфекции, обычно включают в себя этап так называемого «аналитического прерывания» [2, 32]. К испытаниям привлекаются только пациенты, в течение нескольких лет демонстрирующие успех АРТ. После применения направленного воздействия пациентам отменяют АРТ и производят наблюдение, измеряя показатели вирусной нагрузки, числа Т-клеток, маркеров активации иммунных клеток, а также объема резервуаров и времени до возвращения вирусной нагрузки [33]. Этот последний показатель может сильно варьировать между пациентами, и хотя пока еще не отмечено ни одного случая, когда нагрузка не возвращалась, некоторые виды терапевтических агентов уже показали существенное уменьшение объема резервуаров [34], что дает основания надеяться на успех этой стратегии в будущем и стратегии эрадикации ВИЧ в целом.

Литература

1. Barton, K. HIV-1 reservoirs during suppressive therapy / K. Barton, A. Winckelmann, S. Palmer // *Trends Microbiol.* – 2016. – Vol. 24, No. 5. – P. 345-355.
2. Doyle, T. Low-level viraemia on HAART: significance and management / T. Doyle, A.M. Geretti // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 25, No.1. – P. 17-25.
3. HIV replication at low copy number and its correlation with the HIV reservoir: a clinical perspective / L. Sarmati [et al.] // *Curr. HIV Res.* – 2015. – Vol. 13, No. 3. – P. 250-257.
4. Spivak, A.M. HIV-1 Eradication: Early Trials (and Tribulations) / A.M. Spivak, V. Planelles // *Trends Mol. Med.* – 2016. – Vol. 22, No. 1. – P. 10-27.
5. HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals / D. Trono [et al.] // *Science.* – 2010. – Vol. 329, No. 5988. – P. 174-180.
6. Sahu, G.K. Potential implication of residual viremia in patients on effective antiretroviral therapy / G.K. Sahu // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2015. – Vol. 31, No. 1. – P. 25-35.
7. Pham, H.T. The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies / H.T. Pham, T. Mesplede // *Drugs Context.* – 2018. – Vol. 7. – P. 212522. doi: 10.7573/dic.212522
8. Costiniuk, C.T. HIV reservoir dynamics in the face of highly active antiretroviral therapy / C.T. Costiniuk, M.A. Jenabian // *AIDS Patient Care STDS.* – 2015. – Vol. 29, No. 2. – P. 55-68.
9. Eradication of HIV from tissue reservoirs: challenges for the cure / R. Rose [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2018. – Vol. 34, No. 1. – P. 3-8.
10. Castro-Gonzalez, S. Barriers for HIV cure: the latent reservoir / S. Castro-Gonzalez, M. Colomer-Lluch, R. Serra-Moreno // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2018. – Vol. 34, No. 9. – P. 739-759.
11. Romani, B. Underlying mechanisms of HIV-1 latency / B. Romani, E. Allahbakhshi // *Virus Genes.* – 2017. – Vol. 53, No. 3. – P. 329-339.
12. Combating the HIV reservoirs / G. van Marle [et al.] // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* – 2018. – Vol. 34, No. 1. – P. 76-89.
13. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016 / S.G. Deeks [et al.] // *Nat. Med.* – 2016. – Vol. 22, No. 8. – P. 839-850.
14. Kimata, J.T. Challenges and strategies for the eradication of the HIV reservoir / J.T. Kimata, A.P. Rice, J. Wang // *Curr. Opin. Immunol.* – 2016. – Vol. 42. – P. 65-70.
15. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation / K. Allers [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117, No. 10. – P. 2791-2799.
16. Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient / S.A. Yukl [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9, No. 5. – e1003347.
17. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation / R.K. Gupta [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 568, No. 7751. – P. 244-248.
18. Wang, H. Gene-edited babies: what went wrong and what could go wrong / H. Wang, H. Yang // *PLoS Biol.* – 2019. – Vol. 17, No. 4. – e3000224.

19. Experiments that led to the first gene-edited babies: the ethical failings and the urgent need for better governance / J.R. Li [et al.] // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2019. – Vol. 20, No. 1. – P. 32-38.
20. Current strategies for elimination of HIV-1 latent reservoirs using chemical compounds targeting host and viral factors / M.J. Jean [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2019. – Vol. 35, No. 1. – P. 1-24.
21. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study / A. Saez-Cirion [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9, No. 3. – e1003211.
22. Darcis, G. HIV latency: should we shock or lock? / G. Darcis, B. Van Driessche, C. Van Lint // *Trends Immunol.* – 2017. – Vol. 38, No. 3. – P. 217-228.
23. Perreau, M. Targeted immune interventions for an HIV-1 cure / M. Perreau, R. Banga, G. Pantaleo // *Trends Mol. Med.* – 2017. – Vol. 23, No. 10. – P. 945-961.
24. Ongoing clinical trials of human immunodeficiency virus latency-reversing and immunomodulatory agents / H.M. Delagrèverie [et al.] // *Open Forum Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 3, No. 4. – ofw189.
25. Latency reversal and viral clearance to cure HIV-1 / D.M. Margolis [et al.] // *Science.* – 2016. – Vol. 353, No. 6297. – aaf6517.
26. Barton, K.M. How to define the latent reservoir: tools of the trade / K.M. Barton, S.E. Palmer // *Curr. HIV/AIDS Rep.* – 2016. – Vol. 13, No. 2. – P. 77-84.
27. Siliciano, J.D. Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4+ T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals / J.D. Siliciano, R.F. Siliciano // *Methods Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 304. – P. 3-15.
28. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA / M. Kiselinova [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, No. 1. – e85999.
29. Rouzioux, C. Total HIV DNA: a global marker of HIV persistence / C. Rouzioux, V. Avettand-Fenoel // *Retrovirology.* – 2018. – Vol. 15, No. 1. – P. 30.
30. Sharaf, R.R. The alphabet soup of HIV reservoir markers / R.R. Sharaf, J.Z. Li // *Curr. HIV/AIDS Rep.* – 2017. – Vol. 14, No. 2. – P. 72-81.
31. HIV-1 latent reservoir: size matters / F. Hodel [et al.] // *Future Virol.* – 2016. – Vol. 11, No. 12. – P. 785-794.
32. Modeling of antilateness treatment in HIV: what is the optimal duration of antiretroviral therapy-free HIV remission? / D. Cromer [et al.] // *J. Virol.* – 2017. – Vol. 91, No. 24. – pii: e01395-17. doi: 10.1128/JVI.01395-17
33. The size of the expressed HIV reservoir predicts timing of viral rebound after treatment interruption / J.Z. Li [et al.] // *AIDS.* – 2016. – Vol. 30, No. 3. – P. 343-353.
34. HIV-1 latent reservoir size and diversity are stable following brief treatment interruption / D.B. Salantes [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2018. – Vol. 128, No. 7. – P. 3102-3115.

HIV INFECTION CURE STRATEGIES: BASIC APPROACHES AND DIFFICULTIES OF THEIR IMPLEMENTATION

Bobkova M.R.

Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

The review article is devoted to the state-of-the-art of eradication and functional cure of HIV infection. The issues related to the history of the discovery, characteristics and origin of the main HIV reservoirs, theoretical approaches to their elimination, examples of the clinical cure of HIV infection and the principal directions of developing tools for targeted destruction of latently infected cells are discussed shortly. The circle of methodological approaches for measuring the reservoirs volume is outlined, their advantages and disadvantages are characterized. The procedure for HIV eradication agents clinical trials, including the period of analytical interruption of antiretroviral therapy, is described.

Keywords: HIV, antiretroviral therapy, reservoir, eradication, functional cure.

Поступила 16.09.2019

**ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ**

¹Амвросьева Т.В., ¹Аринович А.С., ¹Кишкурно Е.П., ¹Поклонская Н.В.,
¹Богуш З.Ф., ¹Шилова Ю.А., ¹Бельская И.В., ¹Лозюк С.К.,
²Минаковская Н.В., ²Марейко Ю.Е.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минский р-н, Боровлянский с/с, д. Боровляны, Республика Беларусь

Резюме. В настоящей работе представлены результаты исследований биологического материала детей-реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в отношении 9 возбудителей вирусных инфекций: полиомавирусов ВКВ и JCV, цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вирусов герпеса человека 6 и 7 типов (HHV-6, HHV-7), аденовирусов (AdV), вируса варицелла-зостер (VZV), норовирусов (NoV). Проанализирована частота выявления данных инфекций на протяжении первых 100 дней посттрансплантационного периода. Доминирующими оказались ВКВ-инфекция (75%), а также HHV-6 и HHV-7 инфекции (70% и 60%, соответственно).

Ключевые слова: трансплантация, гемопоэтические стволовые клетки, дети, вирусные инфекции, генодиагностика.

Введение. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является спасительной процедурой для лечения многих гематологических злокачественных заболеваний, врожденных патологий и костномозговой недостаточности различных типов. Вследствие интенсивной иммунной супрессии в период до и после ТГСК, реципиенты становятся уязвимыми для множества патогенов, в том числе и вирусных. Инфекции, вызываемые полиомавирусами (ВКВ и JCV), цитомегаловирусом (CMV), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), вирусами герпеса человека 6 и 7 типов (HHV-6, HHV-7), аденовирусами (AdV), вирусом варицелла-зостер (VZV), норовирусом (NoV), могут стать причиной тяжелых осложнений, а даже и гибели пациента.

Самой распространенной из перечисленных является полиомавирусная инфекция. Согласно данным зарубежных исследователей, ВКВ-вирурия (выделение вируса с мочой) с высокой вирусной нагрузкой может наблюдаться у 50-60% реципиентов ГСК, и в 25% случаев существует вероятность развития геморрагического цистита (ГЦ). Установлены также пороговые значения вирусной нагрузки, при которых у пациента возрастает риск развития ГЦ. При вирурии – это 10^7 копий ДНК вируса в мл, а при виремии – 10^3 копий/мл. Реактивация JCV-инфекции, из-за нейротропности вируса, в редких случаях может стать причиной прогрессивной мультифокальной лейкоэнцефалопатии (ПМЛ) – тяжелого фатального заболевания центральной нервной системы [1].

Большинство герпесвирусных инфекций характеризуются тем, что способны к латентному течению. Для иммуносупрессированных пациентов они могут стать жизнеугрожающими и даже фатальными. Так, частота выявления CMV-инфекции у реципиентов ГСК составляет от 30% до 50%. Она проявляется в виде пневмонии (потенциально фатальной, часто без специфических симптомов), ретинитов, гастроэнтеритов и энцефалитов [1].

EBV для обсуждаемой категории пациентов опасен тем, что может вызывать энцефалит/миелит, пневмонию, гепатит, а также посттрансплантационную лимфопролиферативную болезнь, являющуюся одним из самых тяжелых осложнений после аллогенной ТГСК(алло-ТГСК) [2].

Среди герпетических вирусных агентов особое внимание следует уделить розеоловирусам (род *Roseolovirus*), включающим HHV-6 и HHV-7. Как известно, HHV-6-инфекция ассоциируется с посттрансплантационным энцефалитом, пневмонией, развитием острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Наибольшую опасность представляет хромосоминтегрированная форма ВГЧ-6 (хиВГЧ-6), которая вызывает злокачественное течение инфекции, характеризующейся необычно высокой вирусной нагрузкой в крови и во всех других тканях организма. HHV-7, как и HHV-6, вызывает неврологические патологии, на что указывают пока еще редкие исследования по этой проблеме. Вместе с тем известно, что он может выступать в качестве кофактора при реактивации CMV-инфекции [1, 3].

В перечне известных герпесвирусных посттрансплантационных патологий выделяют также VZV-инфекцию, которая у реципиентов ГСК протекает в тяжелой диссеминированной форме.

AdV-инфекция наиболее часто встречается в первые 50 дней после трансплантации. Она является причиной развития геморрагического цистита, энтерита, а также гепатита, энцефалита, пневмонии, миокардита и диссеминированной инфекции. По данным зарубежных исследований у 57% реципиентов ГСК в фекалиях были выявлены вирусы, у 33% регистрировалась виремия. Все пациенты, у которых развилась виремия, в дальнейшем погибли. При этом регистрация пороговых значений вирусной нагрузки ($>10^5$ копий/мл) в фекалиях является предиктором виремии и диссеминации вируса.

В целом летальность от вирусных менингитов/энцефалитов (в том числе AdV этиологии) у детей-реципиентов ГСК варьирует от 0 до 80%, в зависимости от возбудителя, скорости установки диагноза и оперативности назначения специфической терапии.

Этиологическим агентом у до 22% всех детей-реципиентов ГСК с диареей признается NoV. Чаше осложнения, вызванные этой инфекцией, развиваются у пациентов, для которых ТГСК выполняется повторно и/или у них имеются признаки РТПХ. Следует отметить, что для людей с нормальным иммунным статусом NoV-инфекция не несет особой угрозы. Однако у реципиентов ГСК она может проявляться как в виде энтерита, хронической диареи, так и приводить к острой почечной недостаточности, пневматозу кишечника, перитониту, вторичной бактериемии вплоть до фатального исхода. При этом длительное время NoV-инфекция может протекать бессимптомно, и в этом случае пациент будет выступать вирусоносителем и заражать окружающих [1].

Материалы и методы. Исследовано 212 проб биологического материала (101 проба крови, 74 пробы мочи, 35 проб слюны или мазков из зева, 1 проба СМЖ, 1 пробы асцитной жидкости), полученных от 18 пациентов за январь – август 2019 года из ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии». Установлена следующая периодичность отбора и исследования материала: до трансплантации – 1 раз, в первые 100 дней после ТГСК – 1 раз в 2 недели, спустя 100 дней – по показаниям. Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из образцов биологического материала использовали набор «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкцией по применению. Выявление ДНК BKV, JCV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, AdV, VZV, РНК NoV проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Детекцию ДНК BKV и JCV осуществляли согласно методике определения ДНК полиомавирусов (утверждена в виде стандартной операционной процедуры, 2019 г.) с использованием взятых из литературных источников праймеров (PM2+, PM2-) и зондов (BKVp,

JCVp) [4]. Количественное выявление ВКВ проводили с использованием «Набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК ВКВ методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией» (Республика Беларусь). Детекцию ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6, VZV осуществляли с использованием наборов реагентов "АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL", "АмплиСенс VZV-FL" (Россия). ДНК ВГЧ-7 детектировали с помощью праймеров и зонда, взятых из литературного источника [5]. Выявление АдВ и НоВ осуществляли тест-системой «ОКВИ-ПЦР» (Республика Беларусь). Постановку ПЦР проводили на амплификаторе RotorGeneQ (CorbettLifeSciences, Австралия).

Результаты исследования и обсуждение. Обследовано 18 реципиентов ГСК в возрасте от 9 месяцев до 22 лет, находящихся на лечении в ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии». Двум из них трансплантация ТГСК была выполнена дважды. Все пациенты получили аллотрансплантат, что указывает на более высокий риск развития осложнений, по сравнению с ауто трансплантацией. В перечень патологий, приведших к алло-ТГСК вошли:

- острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ);
- острый миелоидный лейкоз (ОМЛ);
- первичный иммунодефицит (ПИД);
- лимфома Ходжкина (лимфогранулематоз);
- ALK-позитивная лимфома;
- приобретенная апластическая анемия (ПАА);
- миелодиспластический синдром (МДС);
- анемия Даймонда-Блекфена.

По результатам проведенных генодиагностических исследований доминировали ВКВ-инфекция, которая развилась у 75% реципиентов (n=20), а также ВГЧ-6 и ВГЧ-7-инфекции, зарегистрированные у 70% и 60% реципиентов (n=20), соответственно (рисунок 1).

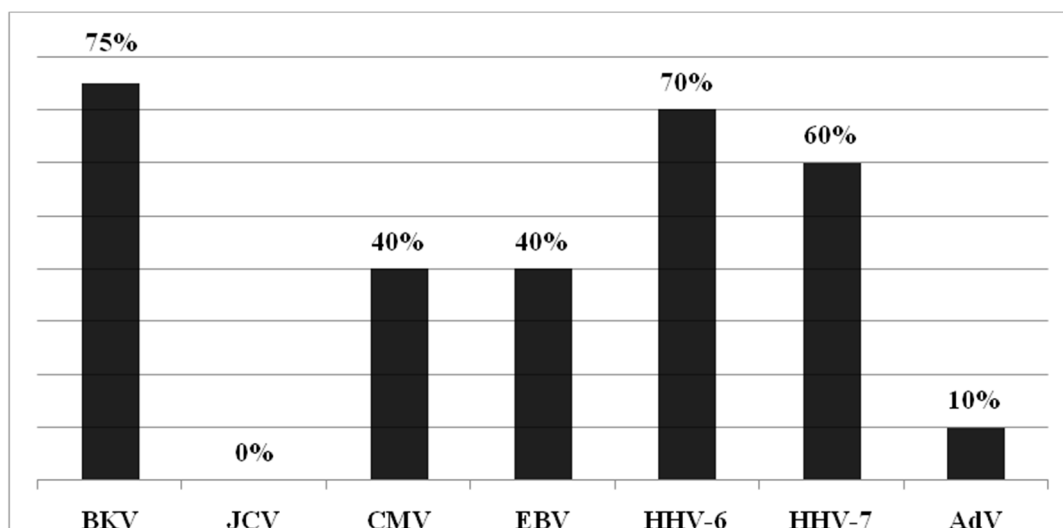


Рисунок 1. – Частота выявления возбудителей вирусных инфекций у детей после алло-ТГСК (n=20)

ВКВ-инфекция сопровождалась вирурией. Однако, у 20% из 75% ВКВ-позитивных реципиентов имела место вирусемия. При этом уровни вирусной нагрузки в крови колебались в значениях до $4,5 \times 10^7$ копий/мл, а в моче – до 1×10^{11} копий/мл.

Герпесвирусы чаще обнаруживались в образцах клеток крови и слюны, что коррелирует с местами их персистенции (эпителиальные клетки слюнных желез, В-лимфоциты). Активная форма инфекции (вирусная ДНК детектирована в сыворотке крови) была отмечена у 20% реципиентов из 40% CMV-позитивных (вирусная нагрузка до 5×10^2 копий/мл), у 15% реципиентов из 40% EBV-позитивных (вирусная нагрузка до 4×10^2 копий/мл), у 25% реципиентов из 70% HHV-6-позитивных (вирусная нагрузка до 2×10^3 копий/мл) и 5% реципиентов из 60% HHV-7-позитивных.

Обследование на VZV и NoV проводилось по клиническим показаниям. В отношении VZV исследован биологический материал 2 пациентов, у обоих данный возбудитель не обнаружен. У пациентки с ОЛЛ 3 лет в раннем периоде после аллогенной неродственной совместимой ТГСК развился тяжелый энтероколит с наличием мелкопятнистой сыпи. Выявлена высокая вирусная нагрузка AdV в крови и фекалиях, в фекалиях также обнаружен NoV. Ребенок был пролечен цидофовиром, что привело к его полной санации и выздоровлению.

Для изучения частоты развития доминирующих вирусных инфекций у наблюдаемых детей-реципиентов ГСК образцы их биологического материала отбирали до ТГСК и в первые 100 дней после нее с периодичностью 1 раз в 2 недели, а в более поздние сроки – по показаниям (рисунок 2).

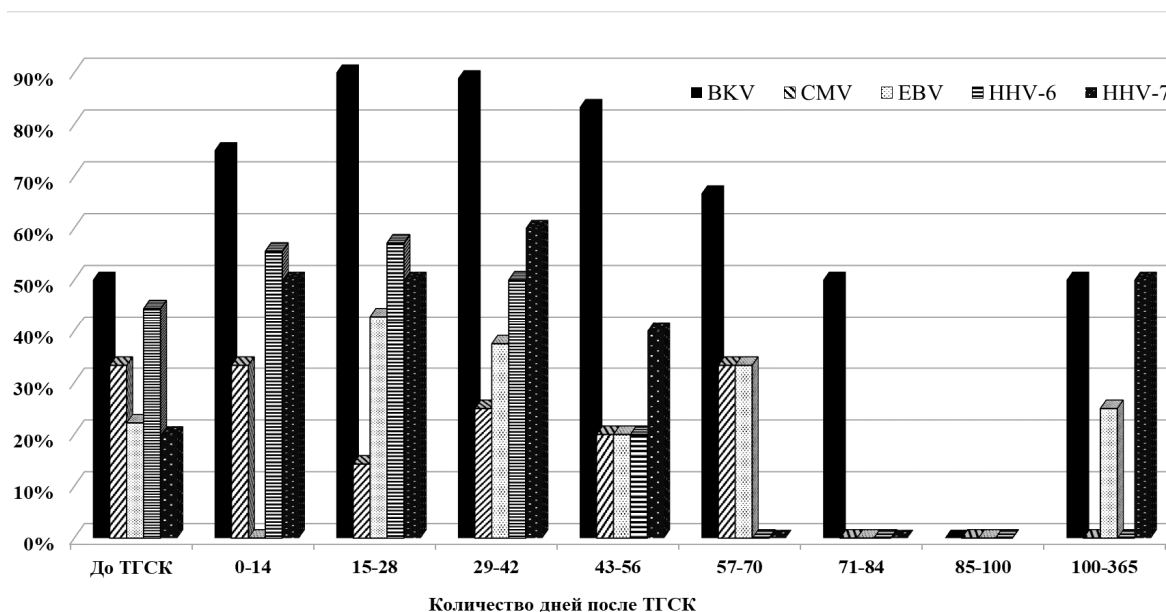


Рисунок 2. – Частота развития вирусных инфекций при ТГСК у детей-реципиентов в разные сроки наблюдения (n=20)

Согласно результатам выполненных генодиагностических исследований генетические маркеры BKV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7 обнаруживались ещё в предтрансплантационном периоде, т.е. во время проведения кондиционирования. Частота развития BKV-инфекции достигала пика к 1 месяцу после ТГСК, а затем плавно снижалась. CMV-инфекция регистрировалась в течение первых 2 месяцев. Пики развития EBV-, HHV-6-, HHV-7-инфекций приходились на период 1-1,5 месяцев после ТГСК. В более поздние сроки данные вирусы выявлялись спорадически.

Заключение. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о достаточно высокой частоте развития полиомавирусной и герпетической (BKV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7) инфекций у детей при ТГСК. Они указывают на необходимость дальнейших более углубленных и системных исследований, направленных на разработку и внедрение в практику специальных алгоритмов обследования и лечения этой категории

пациентов, основанных на использовании персонализированного подхода и количественных методов генодиагностики.

Литература

1. Ljungman, P. Viral infections / P. Ljungman, J. Styczynski, H. Einsele // The EBMT Handbook. – Springer, Cham, 2019. – P. 281-290.
2. Posttransplant lymphoproliferative disorder in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience and literature review / Y.V. Skvortsova [et al.] // Cell. Ther. Transplant. – 2017. – Vol. 6, No. 2. – P. 8-25.
3. Human herpes virus-6 DNA in cerebrospinal fluid of children undergoing therapy for acute leukaemia / B. Wittekindt [et al.] // Brit. J. Haematol. – 2009. – Vol. 145, No. 4. – P. 542-545.
4. Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies / A. Bárcena-Panero [et al.] // Compar. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 35, No. 2. – P. 173-179.
5. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7 / K. Wada [et al.] // Microbiol. Immunol. – 2009. – Vol. 53, No. 1. – P. 22-29.

VIRAL INFECTIONS AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION IN CHILDREN

¹Amvosieva T.V., ¹Arynovich A.S., ¹Kishkurno E.P., ¹Paklonskaya N.V., ¹Bohush Z.F., ¹Shilava Y.A., ¹Belskaya I.V., ¹Lazyuk S.K., ²Minakovskaya N.V., ²Mareika Y.E.

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

²Republican Research & Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology & Immunology, Minsk,

In this study we showed the results of detection of 9 viruses in biological samples of pediatric recipients of hematopoietic stem cells. These viruses are: polyomaviruses BKV and JCV, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpes viruses 6 and 7 (HHV-6, HHV-7), adenoviruses (AdV), varicella-zoster virus (VZV), noroviruses (NoV). We analyzed the frequency of viral detection during first 100 days after transplantation. BKV-infection (75%), HHV-6 and HHV-7-infections (70% and 60%, respectively) were dominant.

Keywords: hematopoietic stem cell, transplantation, children, viral infections.

Поступила 09.09.2019

БЛЯШЕЧНЫЕ МУТАНТЫ ВИРУСОВ В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ

Бореко Е. И., Павлова Н. И., Владыко Г. В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Приводится анализ образования бляшечных мутантов вирусов при исследовании противовирусных свойств различных синтетических соединений, продуктов природного происхождения и лекарственных средств агар-диффузионным методом «скрининг-тест». Феномен проявляется в виде концентрической зоны бляшек, отличающихся четкостью и размером, вокруг центра-источника исследуемого вещества (химо-вирус зависимые бляшки, ХВБ). Образование ХВБ, повторяющееся на двух или более тест-вирусах (использованы РНК-вирусы болезни Ньюкастла, гриппа A/FPV/Rostock, везикулярного стоматита, Венесуэльского энцефаломиелита лошадей, ротавирус, вирус парагриппа 3 типа и респираторно-синцитиальный вирус, ДНК-вирусы герпеса простого I типа и оспенной вакцины), чаще всего проявилось при исследовании азотсодержащих гетероциклических соединений (24,1%), а также серо-, фосфорсодержащих (по 11,7%) и ароматических (11,0%) соединений. Проявление феномена с наибольшим количеством тест-вирусов установлено для N-(4-метоксифенил)бензамида, β-хлорэтиламида 4-(N-1-адамантилсульфамил)оксаниловой кислоты, бромида метил-3-(2-β-фенилэтил-2,2-диметилгидразиний)пропионата. Бляшкообразование вблизи центра-источника наблюдали также при исследовании многих веществ, представляющих собой амины, амиды, N-замещенные амиды, (ароматические, гетероциклические, фосфорсодержащие, сульфосоединения), растительных комплексов, некоторых индивидуальных растений, культуральных жидкостей, природных ископаемых и лекарственных средств.

Ключевые слова: бляшечные мутанты, агар-диффузионный метод, ДНК- и РНК-вирусы, противовирусные свойства, синтетические соединения, продукты природного происхождения, медикаменты.

Введение. Ранее нами был проведен анализ частоты образования бляшечных мутантов вирусов при исследовании противовирусных свойств различных синтетических соединений, продуктов природного происхождения и лекарственных средств агар-диффузионным методом «скрининг-тест» [1]. Феномен проявлялся в виде концентрической зоны бляшек, отличающихся четкостью и размером, вокруг центра-источника. 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 (33,6% всех случаев), гриппа FPV/Rostock (19,6%), везикулярного стоматита (19,4%), и было сравнительно редким с вирусом Венесуэльского энцефаломиелита лошадей, ротавирусом, вирусом парагриппа 3 типа и респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом ECHO 6 (5,9; 1,5; 1,1 и 1,0% соответственно). Ситуация с ДНК-вирусами привлекла внимание высокой частотой образования бляшечных мутантов при исследовании с вирусом герпеса простого I типа (16,5%), практически на уровне РНК-вирусов гриппа FPV/Rostock и везикулярного стоматита, в то время как с вирусом оспенной вакцины явление было редким (1,4%). Обсуждалось использование различных культур клеток (эмбриональные первичные, пассируемые, линии клеток) и высокий генный полиморфизм как возможные причины наблюдаемых различий. В частности, сделан вывод о том, что высокая частота образования бляшеч-

ных мутантов при исследовании противовирусной активности веществ методом скрининг-тест с вирусом герпеса простого I типа может быть обусловлена высокой вариабельностью ДНК герпесвирусов, известной из литературных данных.

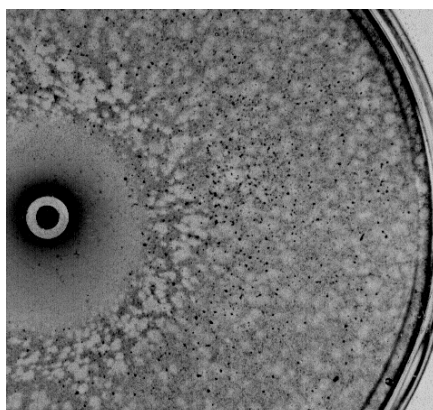
В продолжение и дополнение к этой работе приводится анализ принадлежности исследованных веществ с проявлением бляшечных мутантов к различным классам и группам.

Материалы и методы исследования. Синтетические соединения и продукты природного происхождения были получены из ряда научных учреждений бывшего СССР, лекарственные растения предоставлены учебными и производственными организациями Беларуси, лекарственные средства приобретены в аптечной сети. Названия и формулы синтетических веществ представлены в соответствии с данными авторов синтеза.

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 энцефаломиелита 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.

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). Исследование противовирусной активности веществ проводили на монослойных культурах клеток, выращенных в чашках Петри, которые инфицировали соответствующими вирусами, покрывали расплавом агарсодержащей питательной среды, в которой после застывания устанавливали отрезки стеклянной трубки с растворами или суспензиями исследуемых веществ. После завершения инкубационного периода места гибели клеток, образованные вирусами в результате радиального распространения процесса вовлечения в репродукцию новых клеток (бляшки) становились видимыми благодаря наличию в питательном покрытии витального красителя. Измеряли диаметры концентрических зон токсичности и подавления образования бляшек вокруг источников веществ, образующихся в результате диффузии в агаровом покрытии (агардиффузионный метод «скрининг-тест»). Бляшки вблизи центра-источника, отличающиеся от остального газона и свидетельствующие об образовании мутантов вирусов, обозначали также как химио-вирус зависимые (ХВБ) [2] (рисунок). Более детально проводимые манипуляции описаны в работе, опубликованной ранее [1].

Результаты исследования и обсуждение. В группах веществ, сформированных в основном по признаку строения, бляшкообразование вблизи источника диффузии наиболее часто имело место среди гетероциклических соединений (38,1 %). Небольшое превышение процента соединений, в присутствии которых обнаружены ХВБ, над процентом количества исследованных веществ отмечено в группах ароматических, фосфорорганических, четвертичных аммониевых соединений, полимеров (таблица 1). По этим данным сложно судить об очевидном преобладании явления среди представителей той или иной группы веществ, создается впечатление, что это в значительной степени определяется количественным составом групп. Вместе с тем, процент соединений с ХВБ заметно ниже в группах серосодержащих, природных, комплексных соединений, алмазанов и медикаментов.



Слева направо: центр-источник исследуемого вещества, зона токсичности, зона образования ХВБ, газон обычных бляшек

Рисунок. – Участок чашки Петри с проявлением бляшечных мутантов вируса гриппа A/FPV/Rostock (H1N1)

Таблица 1. – Группы веществ, в присутствии которых проявилось бляшкообразование вблизи центра-источника или у края зоны токсичности

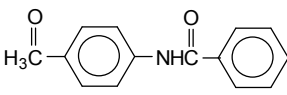
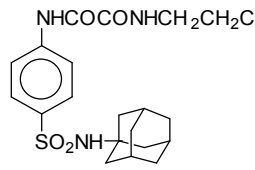
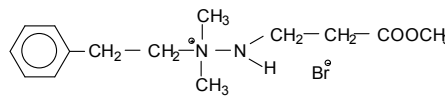
Группа веществ	Всего исследованных		С ХВБ	
	абс.	%	абс.	%
Всего	9 279	100	654	100
Гетероциклические	3 516	37,9	249	38,1
Ароматические	856	9,2	74	11,3
Фосфорорганические	329	3,5	32	4,9
Адамантаны	686	7,4	28	4,3
Серосодержащие	576	6,2	7	1,1
Полимеры	124	1,3	31	4,7
Алифатические	193	2,1	17	2,6
Алициклические	388	4,2	20	3,1
Нуклеозиды	441	4,7	20	3,1
Четвертичные аммониевые	69	0,7	16	2,4
Комплексные	347	3,7	11	1,7
Краун-эфир	22	0,2	6	0,9
Природные	561	6,0	27	4,1
Элементоорганические	142	1,5	7	1,1
Медикаменты	728	7,8	18	2,7

Образование ХВБ, повторяющееся на различных тест-вирусах (двух или более), чаще всего проявилось при исследовании азотсодержащих гетероциклических соединений (24,1%), а также серо-, фосфорсодержащих (по 11,7%) и ароматических (11,0%) соединений. Проявление феномена с наибольшим количеством тест-вирусов установлено для ароматического и сульфосоединения, четвертичного аммониевого соединения (таблица 2).

В большинстве случаев проявление феномена не сопровождалось наличием зон токсичности исследуемого вещества, а также зон ингибирования образования бляшек. Учет бляшкообразования вблизи центра-источника не являлся главной целью выполнения исследований и представлял интерес только в случае наличия у исследуемых веществ противовирусных свойств, поскольку это влияло на широту диапазона нетоксических концентраций, ингибирующих репродукцию тест-вируса. Такое сочетание

наличия ХВБ и противовирусного действия в виде зоны ингибирования образования вирусных бляшек имело место при исследовании соединений алициклического ряда с противовирусными свойствами (лекарственные средства амантадин, ремантадин, дейтифорин, новые соединения каркасного строения, в основном гидрохлориды amino-, аминометил-, аминоэтил-алициклов) в отношении орто- и парамиксовирусов (вирусы гриппа А и В, парагриппа 3 типа, респираторно-синцитиальный вирус).

Таблица 2. – Соединения, в присутствии которых бляшкообразование вблизи центра-источника или у края зоны токсичности проявилось с наибольшим количеством тест-вирусов

Название	Тест-вирусы	Структурная формула
N-(4-метоксифенил)бензамид	ВГП-1, ВКЧП, ВВС, ВБН, ВВЭЛ	
β-хлорэтиламид 4-(N-1-адамантилсульфамил)оксаниловой кислоты	ВГП-1, ВОВ, ВБН, ВВЭЛ	
Бромид метил-3-(2-б-фенилэтил-2,2-диметилгидразиний)пропионата	ВГП-1, ВКЧП, ВВС, ВБН	

Бляшечные мутанты вируса гриппа, образовавшиеся в присутствии высоких концентраций алициклических производных с противовирусным действием 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].

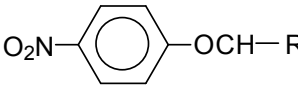
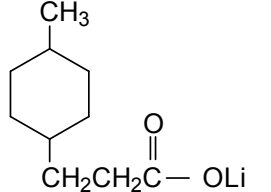
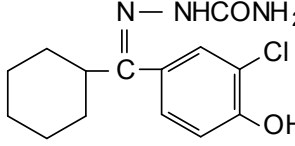
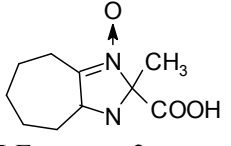
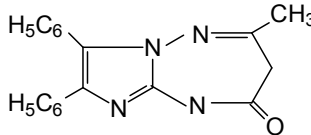
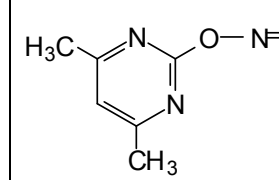
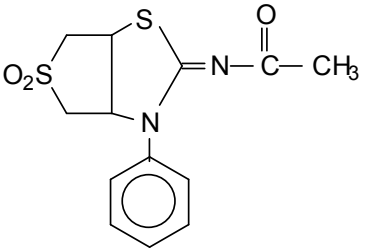
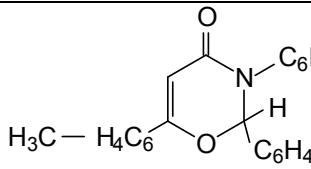
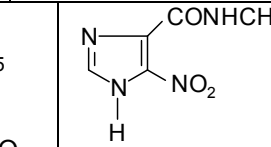
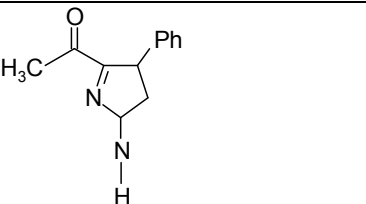
В процессе очистки и концентрирования данный вариант вируса сохраняет лишь 0,9 % своей гемагглютинирующей активности в сравнении с 8,7 % у исходного и 5,1 % — у ремантадинрезистентного вариантов. В результате снижается его плавучая плотность в градиенте концентраций хлорида цезия, что согласуется с характерной морфологией вирионов, утративших поверхностные гликопротеины [5, 6].

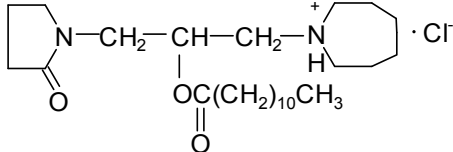
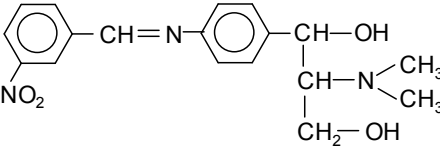
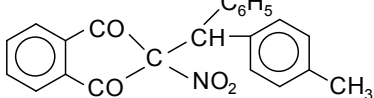
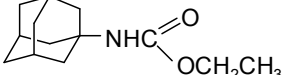
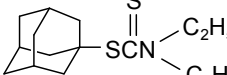
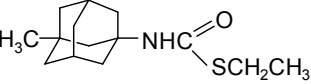
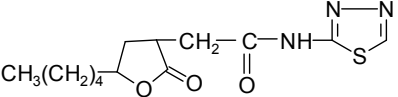
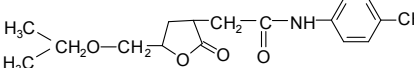
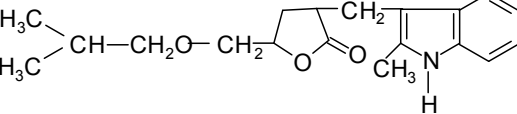
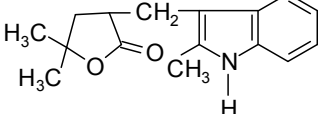
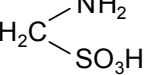
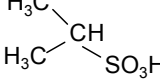
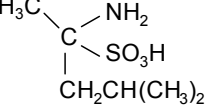
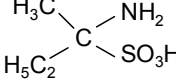
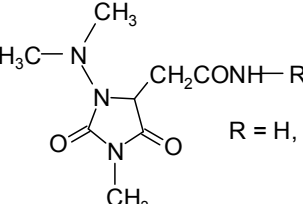
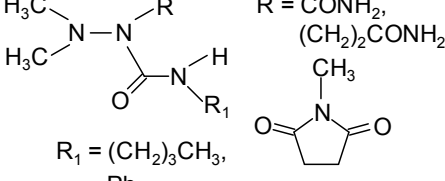
Другая группа веществ, также исторически сложившаяся как источник противовирусных средств, представлена соединениями, содержащими амидную (карбоксамидную) группу в своей структуре (в том числе известные противовирусные средства широкого спектра действия рибавирин, фавипиравир). Многие из таких соединений при исследовании противовирусных свойств методом «скрининг-тест» характеризовались

проявлением феномена ХВБ. В нашем распоряжении имелся рибавирин, и хотя в присутствии субстанции средства вирусные бляшки вблизи резервуара-источника не замечены, установлено, что в концентрациях 3–25 мкг/мл рибавирин не препятствует проявлению ХВБ (ВКЧП) под влиянием одновременно присутствующего ремантадина (0,7–25 мкг/мл) [7]. Бляшкообразование вблизи центра-источника наблюдали также у многих веществ, представляющих собой амины, амиды, N-замещенные амиды, (ароматические, гетероциклические, фосфорсодержащие, сульфосоединения), не проявивших противовирусного действия.

Преимущественное проявление феномена при исследовании синтетических веществ разных групп в зависимости от используемого тест-вируса в основном не установлено. Так, с ароматическими и алициклическими соединениями, содержащими амидную, нитро-, цианогруппу бляшкообразование наблюдали с ВГП-1, ВКЧП, ВБН и ВВЭЛ. Однако имеются и некоторые индивидуальные отличия в зависимости от использованного тест-вируса. Наибольшее количество таких веществ, причем в разных химических группах, обнаружено при выполнении исследований с ВГП-1: эфиры паранитрофенола, циклогексилпроизводные (пропионат лития и семикарбазон), метилпентаметилен-имидазолин-оксид, дифенил-имидазотриазепинон, диметилпиримидинил-оксим-метилэтилкетон, ацетилимино-фенил-гексатиено[3,4-d]тиазол-диоксид, метилфенил-нитрофенил-фенил-дигидро-оксозинон, нитроимидазол-карбонилглицин, ацетилфенилпиразолин (табл. 3).

Таблица 3. – Вещества, при исследовании которых феномен ХВБ установлен только для одного тест-вируса (слева направо по строкам таблицы)

<p>ВГП-1</p>  <p>Эфиры паранитрофенола</p>	 <p>4-Метилциклогексилпропионат лития</p>	 <p>Семикарбазон циклогексил-3-хлор-4-гидроксифенил-кетона</p>	 <p>1-Гидрокси-2-карбоксии-2-метил-4,5-пентаметилен-3-имидазолин-3-оксид</p>
 <p>2-Метил-5-(b-оксиэтил)-7,8-дифенилимидазо[1,2-b][1,2,4]триазепин-4-он</p>	 <p>O-(4,6-диметилпиримидинил-2)-оксим-метилэтилкетона</p>	 <p>2-Ацетилимино-3-фенил-2,3,3а,4,6,6а-гексатиено[3,4-d]тиазол-5,5-диоксид</p>	
 <p>6-n-Метилфенил-2-n-нитрофенил-3-фенил-3,4-дигидро-2Н-1,3-оксозин-4-он</p>	 <p>5-Нитроимидазол-4-карбонилглицин</p>	 <p>3-Ацетил-4-фенил-2-пиразолин</p>	

ВОВ	ВКЧП	
 <p>1-(2-Оксопирролидинил)-2-лаурилокси-3-гексаметиленаминопропан гидрохлорид</p>	<p>Нитробензилиден-анилин и нитробензгидрил-индандион</p>  <p>L-(+)-трео-4-(2-диметиламино-1,3-диоксипропил)-N-(3-нитробензилиден)анилин</p>	
 <p>2-Нитро-2-(n-метилбензгидрил)индандион-1,3</p>	<p>Адамантилкарбаматы</p>  <p>N-адамантил-1-этилкарбамат</p>  <p>N,N-диэтиладамантил-1-дитиокарбамат</p>	
 <p>N-3,5-диметиладамантил-1-S-этилтиокарбамат</p>	<p>Толиламид-, тиадиазол- и индолил-производные бутано- и пентанолида</p>  <p>2-(1,3,4-Тиадиазолкарбаомилметил)-4-амил-4-бутанолида</p>  <p>N-толиламид-2-карбоксиметил-5-изопропокси-4-пентанолида</p>	
 <p>2-(2-Метилиндолил-3-метил)-5-изобутокси-4-пентанолид</p>	 <p>2-(2-Метилиндолил-3-метил)-4,4-диметил-4-бутанолид</p>	
ВБН		
Сульфокислоты		
 <p>Аминометансульфокислота</p>	 <p>1-Аминоэтан-1-сульфокислота</p>	
 <p>2-Амино-4,4-диметилбутан-2-сульфокислота</p>	 <p>2-Аминобутан-2-сульфокислота</p>	
Аминокарбонил- производные		
 <p>Аминокарбонилметил-гидантоины</p>	 <p>Аминокарбонилгидразино-пропионамид и сукцинамид</p>	

PCB			
Метилловые и цианометилловые эфиры карбоновых кислот		$\text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CN})-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$	$\text{C}_{10}\text{H}_7(\text{CN})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})=\text{C}(\text{H})-\text{COOCH}_3$
$\text{J}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{COOCH}_3$ <p>Метилловый эфир 4-(п-йодфенокси)-2-бутиновой кислоты</p>		<p>2-Циано-4-метокси-метилловый эфир коричневой кислоты</p>	<p>Транс-2-циано-3-нафтил-метилловый эфир-в-акриловый кислоты</p>
Другие вещества		BBC	
<p>5-амино-1,2,3-триадиазол-4-N-бензилкарбоксамид</p>		<p>6-{2-[2-(4-Нитрофенилвинил)-4-оксихинолил-3-карбониламино]-2-фенилацетидамо}пенициллановая кислота</p>	
<p>9-(Пропаргиллоксиметил)аденин</p>		<p>1-(Аллилоксикарбонилметил)цитозин</p>	
ВВЭЛ		ЕСНО	
<p>N-(α-цианацетил)фенилаланин, этиловый эфир</p>		<p>4,5-Дибром-2-метил-5-(4-нитрофенил)-3-пентанон</p>	
<p>2,4-Ди[N'-(м-нитрофенил)уреидо]-толуол</p>		<p>Диамид 2-(2,2-диметилгидразино)янтарной кислоты</p>	
$\text{H}_3\text{CNHC(=S)CH}_2\text{CONHC(=S)CH}_3$ <p>2-Тио-N-метиламидацет-N-метиламид</p>		<p>Никелевая соль 6-(2,6-диметоксibenзоил)аминопенициллановой кислоты</p>	

С гидрохлоридом оксопирролидинил-лаурилокси-гексаметиленаминопропана феномен выявлен только в исследованиях с ВОВ, с нитробензилиден-анилином и нитробензгидрил-индандионом, адамантилкарбаматами, толиламид-, триадиазолил- и индоллил-производными бутано- и пентанолида — с ВКЧП, с сульфокислотами, аминокарбонилметил-гидантоинами, аминокарбонилгидразино-пропионамидом и сукцинамидом, аминокарбонилметил-гидантоинами, аминокарбонилгидразино-пропионамидом и сукцинамидом — с ВБН, с метиловыми и цианометиловыми эфирами карбоновых кислот — с РСВ, с производными пенициллановой кислоты, аденина и цитозина — с

ВВС, с этиловым эфиром цианацетилфенилаланина, дибромметилнитрофенилпентаноном — с ВВЭЛ, с тиометиламидом — с ЕСНО.

С ВБН как с вирусом, образование ХВБ с которым было наиболее частым, феномен проявлялся в тех же группах, что и с другими вирусами, но с бóльшим количеством веществ.

В группе природных веществ образование ХВБ отмечали при исследовании растительного комплекса, культуральных жидкостей роста бактерий и их фильтратов (ВГП-1, ВКЧП, ВБН, ВВС), феофитина (ВГП-1), сапропелевой грязи (ВКЧП, ВБН), водного настоя цветов мать и мачехи (ВБН), фитостеринов смолы торфяного воска, спиртовых настоек моркови (ВБН) и шрота корня валерианы, оксидатов мха, торфа и бурого угля, сульфатированного глюкоза (ВВС).

В таблице 4 приведена информация о лекарственных средствах, вызвавших эффект бляшкообразования вблизи центра-источника или у края зоны токсичности.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что эффект бляшкообразования вблизи центра-источника или у края зоны токсичности при исследовании противовирусных свойств может проявляться с различными вирусами и веществами практически всех групп. Объем полученного материала не позволяет привести все данные полностью, в рамках настоящего сообщения дана информация о небольшой его части.

Отличие ХВБ в размерах, количестве и четкости от обычных бляшек, образованных на культурах клеток использованными вирусами, может свидетельствовать об усилении репродукции вирусов и их возможном мутагенезе. По-видимому, при этом не следует понимать, что исследованные лекарственные средства, новые синтетические вещества и природные продукты обладают мутагенным эффектом, поскольку проявление феномена определено связано с более высокой концентрацией исследуемого вещества в зоне образования ХВБ в сравнении с достигаемой в организме в случае применения с лечебной целью.

Таблица 4. – Медикаменты, в присутствии которых проявилось бляшкообразование вблизи центра-источника или у края зоны токсичности

Группа	Название	Тест-вирус
Анестетики	Дикаин	ВКЧП и ВВС
Антибиотики	Бициллин-3	ВГП-1
	Бициллин-5	ВГП-1
	Клафоран	ВКЧП
	Леворин	РСВ
	Линкоцин	ВКЧП
Антисептики	Сангвиритрин	ВВЭЛ
Биостимуляторы	Калия оротат	ВКЧП
Витаминные	Аскорутин	ВВС
	Холина хлорид	ЕСНО 6
Гормональные	Норколут	ВГП-1
	Трийодтиронин	ВВС
	Эстриол	ВКЧП
Желчегонные	Никодин	ЕСНО 6
Противорвотные	Церукал	ЕСНО 6
Седативные	Валерианы настойка	ВВС
Сердечные гликозиды	Дигоксин	ВГП-1
Слабительные	Сенадексин	ВВС
Ферментные	Абомин	ВВЭЛ
Химиопрепараты	Нитроксалин	ВКЧП

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 вообще.

Литература

1. Бореко, Е.И. Скрининг-тест: бляшечные мутанты вирусов в присутствии высоких концентраций исследуемых веществ / Е.И. Бореко, Н.И. Павлова, Г.В. Владыко // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2017. — Вып. 10. — С. 222-228. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
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 / О.В. Мосин // Журн. «Самиздат» [Электронный ресурс]. — 2007. — Режим доступа: http://samlib.ru/o/oleg_w_m/cdocumentsandsettingsolegmoidokumentygerpes-wirusyihrepli kacijartf.shtml. — Дата доступа: 15.02.2019.
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, Е.И. Бореко, В.А. Кириллов, В.И. Вотяков // 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.

PLAQUE VIRUS MUTANTS IN THE PRESENCE OF HIGH CONCENTRATION OF SUBSTANCES IN THE STUDY OF ANTIVIRAL PROPERTIES

Boreko E. I., Pavlova N. I., Vladyko G. V.

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

The paper provides an analysis of the formation of plaque virus mutants in the study of the antiviral properties of various synthetic compounds, products of natural origin and drugs by the agar-diffusion method "screening test". The phenomenon manifests itself in the form of a concentric zone of plaques, which are distinguished by clarity and size, around the center-source of the test substance (chemo-virus dependent plaques, CVDP). The formation of CVDP, repeated on two or more test viruses (RNA viruses of Newcastle disease, influenza A/FPV/Rostock, vesicular stomatitis, Venezuelan horse encephalomyelitis, rotavirus, type 3 parainfluenza virus and respiratory syncytial virus, DNA viruses of herpes simplex type I and smallpox vaccines were used), most often manifested in the study of nitrogen-containing heterocyclic compounds (24.1%), as well as sulfur-, phosphorus-containing (11.7% each) and aromatic (11.0%) compounds. The manifestation of the phenomenon with the greatest number of test viruses was found for N-(4-methoxyphenyl) benzamide, β -chloroethylamide 4-(N-1-adamantylsulfamyl) oxanylic acid, methyl 3-(2-b-phenylethyl)-2.2 bromide dimethylhydrazinium propionate. Plaque formation near the source center was also observed in many substances, which are amines, amides, N-substituted amides (aromatic, heterocyclic, phosphorus, sulfo compounds), plant complexes and some individual plants, culture fluids, natural resources, and medicines.

Keywords: plaque mutants, agar diffusion method, DNA and RNA viruses, antiviral properties, synthetic compounds, products of natural origin, medicines

Поступила 12.06.2019

МАЗИ ТРИТЕРПЕНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭФФЕКТИВНЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЖНОМ ГЕРПЕСЕ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

Бореко Е. И., Савинова О. В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Минск, Республика Беларусь

Резюме. Исследованы 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). В результате предварительного изучения ингибирующих свойств в отношении репродукции вируса герпеса простого на культуре клеток, а также вирулицидной активности, отобраны два вещества-лидера, обладающих обоими видами активности одновременно, первое — лидер по вирусингибирующим свойствам, второе — по вирулицидным. Выполнено исследование эффективности образцов 2 % мазей на основе обоих соединений при экспериментальном кожном герпесе белых мышей. Установлено более интенсивное снижение признаков поражения при использовании мази на основе второго соединения-лидера, сравнимое с эффективностью 5 % мази ацикловира. Эффективностью при данной инфекции обладала также 2,5 % мазь бетулина. Полученные данные свидетельствуют о том, что в проявлении эффекта мази на основе тритерпенового соединения с сочетанием вирусингибирующей и вирулицидной активности более важна выраженная вирулицидная составляющая. Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных Исследований, договор № М16Р-012 от 20.05.2016 г.

Ключевые слова: тритерпеноиды, вирус герпеса простого, вирусингибирующие свойства, вирулицидные свойства, экспериментальный кожный герпес

Введение. Исследование связано с выполнением темы НИР «Разработка ингибиторов вирусов герпеса на основе пентациклических тритерпеноидов» по договору с Белорусским Республиканским Фондом Фундаментальных Исследований № М16Р-012 от 20.05.2016. На первом этапе выполнения проекта исследованы противовирусные свойства, вирусингибирующие и вирулицидные, 27 секотритерпеноидов. Среди соединений, обладающих обоими видами активности одновременно, выявлены два вещества-лидера, первое — лидер по вирусингибирующей активности, второе — лидер по вирулицидной активности [1]. Представляло интерес сравнительное исследование эффективности мазей на основе обоих соединений 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. Ацикловир (герпевир) приобретен в аптечной сети.

Экспериментальные образцы мазей исследуемых веществ готовили растиранием навески субстанции в керамической ступке с добавлением небольшого количества мазевой основы (вазелин с добавлением 5 % вазелинового масла). По достижении гомогенности смеси добавляли новые порции основы, снова растирали, и таким образом доводили массу мази до необходимого значения. В качестве препарата сравнения использовали мазь ацикловира. Исследование выполняли на беспородных белых мышах мас-

сой 20–25 г (самки, Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Витебский государственный медицинский институт), использовали вирус герпеса простого 1 типа (штамм 1 С). Вирус поддерживали в рабочем титре ($6 \lg$ ТЦИД₅₀/мл) пассированием на культуре клеток рабдомиосаркомы человека.

Экспериментальный кожный герпес мышей воспроизводили согласно методу, описанному Boyd M.R. et al. (1988) [2], 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 крови эмбрионов крупного рогатого скота). Лечение животных начинали на следующий день и продолжали его до исчезновения признаков поражения в группе мазовой основы (контроль, обычно 9 дней). Мази наносили по 3 раза в день (9:00, 15:00 и 21:00), об их эффективности судили по степени развития признаков поражения в сравнении с контрольной группой животных, лечение которых выполняли только мазовой основой. Основными признаками поражения являлись эритема и наличие пузырьков (корок, струпов, язв на месте их образования, рисунок 1) в местах скарификации. Наличие эритемы в зависимости от степени выраженности и площади охвата оценивали в $\frac{1}{2}$ балла или 1 балл; наличие везикул, корок, струпов, язв — от 1 до 2 баллов (1 балл — изолированные поражения, 2 балла — сливные). Оценки эритемы и наличия везикул суммировали. Для каждой группы животных вычисляли средний балл. Статистическую обработку для оценки достоверности различий между средними значениями в разных группах животных проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики (t-критерий).



а — нормальное ухо, б — эритема, в — эритема и везикулы,
г — ранки в местах образования везикул

Рисунок 1. — Кожные поражения у мышей после инфицирования вирусом герпеса простого

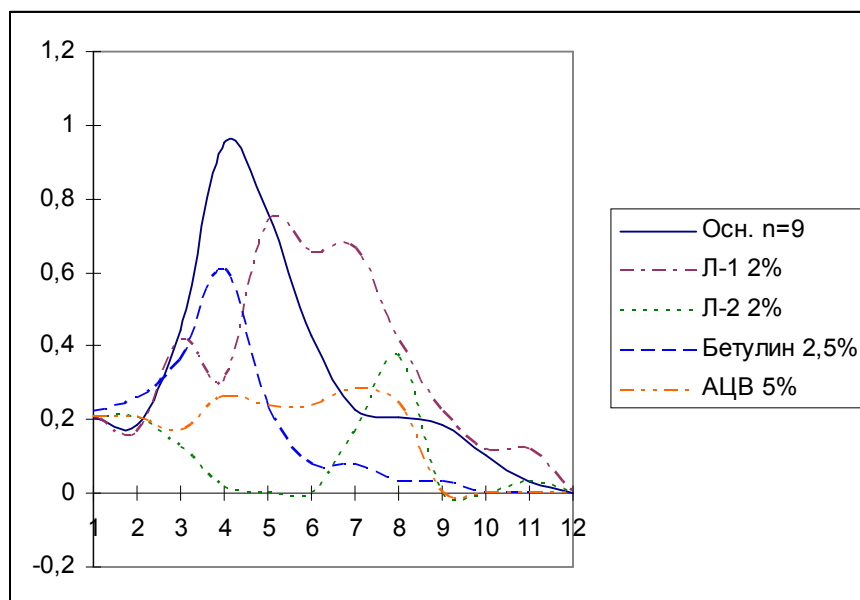
Учитывая неодинаковую начальную реакцию на скарификацию после инфицирования, для удобства отражения динамики развития процесса на графике усредненные экспериментальные данные подвергали дополнительной обработке. Вычисляли общее среднее значение оценок для всех групп животных в первый день после инфицирования ($x_{\text{ср}}$). Разность средних оценок в отдельных группах в первый день наблюдения с общим средним значением ($x_{\text{ср}} - x_i$) суммировали со средними оценками в группах, если поражения в первый день были ниже, или вычитали, если поражения в первый день были выше среднего значения. Далее из полученных результатов вычитали среднюю оценку реакции на скарификацию в группе неинфицированных животных по дням.

Подробное описание метода приводилось нами ранее [3, 4]. 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 экс-

периментально-биологических клиник (вивариев)" с изменениями и дополнениями на 1 января 2014 г.

Результаты исследования и обсуждение. Опытные образцы 2 % мазей обоих веществ-лидеров были исследованы при экспериментальном кожном герпесе белых мышей. Возрастание признаков выраженности инфекции имело место в течение нескольких дней после инфицирования (максимум на 4 день в группе мазовой основы с последующим снижением, рисунок 2). В сравнении с этим, в группе животных, лечение которых проводили мазью первого соединения-лидера (Л-1), имело место снижение выраженности признаков поражения со сдвигом максимума на более поздние (5–7) дни. Различия с усредненными показателями в контрольной группе животных, леченных мазовой основой, статистически достоверны только на 4 день после инфицирования (рисунок 3).

В группе животных с лечением мазью второго соединения-лидера (Л-2) снижение признаков инфекции было более выраженным, со сдвигом максимума на 8 день (статистическая достоверность различий в сравнении с группой мазовой основы на 4–6 дни после инфицирования). Полученные данные свидетельствуют о том, что в проявлении эффекта мази на основе тритерпенового соединения с сочетанием вирусингибирующей и вирулицидной активности более важна выраженная вирулицидная составляющая.



Осн. — мазовая основа, Л-1, Л-2 — 2 % мази исследуемых веществ, АЦВ — 5 % мазь ацикловира (референс-препарат). n — количество животных в группе (9 для группы мазовой основы, 6 для остальных групп). По оси ординат — средняя выраженность поражений, баллы; по оси абсцисс — дни наблюдения.

Рисунок 2. — Динамика выраженности поражений при экспериментальном кожном герпесе белых мышей в условиях применения мазей исследуемых веществ

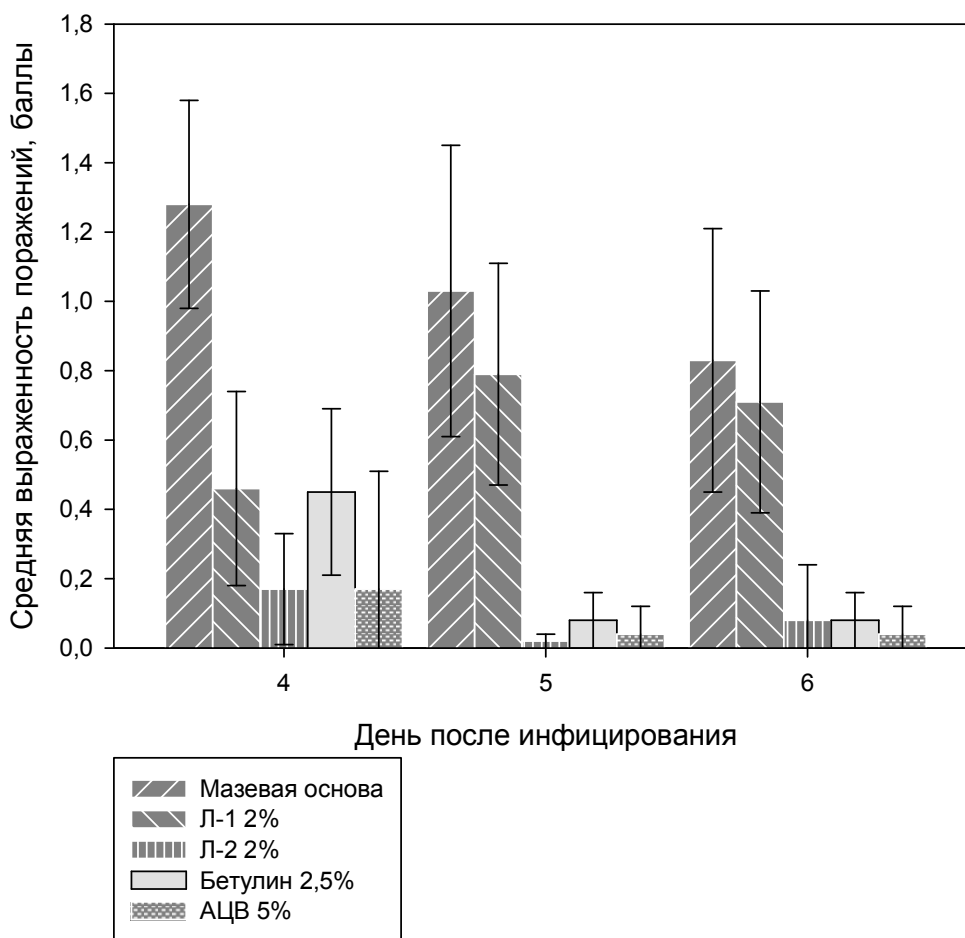


Рисунок 3. — Эффективность мазей исследуемых веществ при экспериментальном кожном герпесе белых мышей на пике инфекции

Исследование эффективности 2,5 % мази бетулина было выполнено нами ранее, добавленные на рисунка данные свидетельствуют о значительной эффективности мази. 5 % мазь ацикловира применяли в этом исследовании как положительный контроль. При ее использовании достигалось снижение признаков поражения кожных покровов животных, сравнимое с эффективностью мази второго соединения-лидера.

Сочетание обоих видов противовирусной активности, вирусингибирующей и вирулицидной, открывает дополнительные возможности использования тритерпеноидов в качестве лекарственных средств. 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 его репродукции в клетках. Такое воздействие приводит к увеличению эффективности и дает новые возможности в выборе средств рациональной терапии герпесвирусной инфекции и профилактики ее рецидивов.

Таким образом, в целом полученные результаты свидетельствуют о том, что тритерпеновые соединения, как природные, так и синтетические, могут обладать двумя видами противовирусных свойств: вирусингибирующим и вирулицидным действием одновременно. Наиболее удачные соединения могут быть применены в качестве субстанций фармакологических композиций наружного применения, предназначенных для лечения герпетической инфекции (герпес простой, герпес опоясывающий).

Тема НИР выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, договор № М16Р-012 от 20.05.2016.

Литература

1. Бореко, Е.И. Секотритерпеновые соединения как ингибиторы вируса герпеса / Е.И. Бореко, О.В. Савинова // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. научн. тр. [Электронный ресурс]. – Минск: ГУ РНМБ, 2017. – Вып. 10. – С. 215–221. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
2. Boyd, M.R. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL 39123) in animals / M.R. Boyd, T.N. Bacon, D. Sutton // *Antimicrob. Ag. Chemother.* – 1988. – Vol. 32, No. 1. – P. 358–363.
3. 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.
4. Бореко, Е.И. Сравнительная противовирусная активность нативных тритерпеноидов / Е.И. Бореко, Н.И. Павлова, О.В. Савинова // *Здравоохранение.* – 2014. – № 10. – С. 65–68.

OINTMENTS OF TRITERPENE COMPOUNDS ARE EFFECTIVE IN EXPERIMENTAL WHITE MOUSE CUTANEOUS HERPES

Boreko E. I., Savinova O. V.

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

The substances obtained as a result of synthetic transformations of the plant pentacyclic triterpene betulin alcohol (substituted secotriterpenoids) from the Institute of Technical Chemistry (a branch of the Federal State Budgetary Institution of Science "Perm Federal Research Center" of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences) are investigated. As a result of a preliminary study of the inhibitory properties against herpes simplex virus reproduction in cell culture, as well as virucidal activity, two leader substances with both types of activity were selected, the first was the leader in virus-inhibiting properties, the second in virucidal. A study of the effectiveness of both compounds 2% ointments in experimental cutaneous herpes of white mice was performed. A higher reduction in signs of damage was found when using the second leader compound ointment, comparable to the effectiveness of 5% acyclovir ointment. 2.5% betulin ointment was also effective in this infection. The data obtained indicate that a pronounced virucidal component is more important in the manifestation of the triterpene compound effect with a combination of virus-inhibiting and virucidal activity. The research was carried out with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Basic Research, contract No. M16R-012 of May 20, 2016.

Keywords: triterpenes, herpes simple virus, virus-inhibiting properties, virucidal properties, experimental cutaneous herpes.

Поступила 19.08.2019

ДИНАМИКА ИЗОЛЯЦИИ ПОЛИОВИРУСОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ СХЕМЫ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

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

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Прекращение применения живой оральной полиовакцины (апрель 2016 г.) и использование только инактивированной вакцины для профилактики полиомиелита в Республике Беларусь привели к существенному снижению циркуляции полиовирусов: от несколько десятков штаммов, ежегодно выделяемых ранее от людей и из объектов окружающей среды, до единичных штаммов, полученных во второй половине 2016 г., 2017 и 2018 гг. (5, 2 и 5, соответственно). Все полиовирусы являлись вакцинными, диких и вакцинородственных штаммов выделено не было. Вероятнее всего, обнаруженные полиовирусы были завезены недавно привитыми лицами из стран, где продолжается применение живой полиовакцины. Выявление таких вирусов отражает правильную тактику вирусологических исследований в рамках надзора за полиомиелитом в стране.

Ключевые слова: полиовирус, живая оральная полиовакцина, инактивированная полиовакцина.

Введение. Программа глобальной эрадикации полиомиелита в настоящее время находится на заключительной стадии своего выполнения. Эндемичными по полиомиелиту остаются лишь три страны мира, Афганистан, Пакистан, Нигерия, где в последние годы регистрируются несколько десятков случаев паралича, обусловленных диким полиовирусом (ПВ) (2016 г. – 37, 2017 г. – 22, 2018 г. – 33), и во всех случаях возбудителем являлся ПВ серотипа 1 [1].

Дикий ПВ серотипа 2 не встречается нигде в мире с 1999 г., что позволило в 2015 г. сертифицировать его глобальную эрадикацию. С апреля 2016 г. во всем мире вакцинный ПВ2 исключен из состава трехвалентной оральной полиовакцины и более не используется для рутинной иммунизации [2]. В то же время, его применение в виде моновакцины предусмотрено в качестве ответных действий для прерывания трансмиссии в популяции нейровирулентных вакцинородственных ПВ этого серотипа. Таким образом, живой вакцинный ПВ2 продолжает вноситься в популяцию человека в особых обстоятельствах и может быть завезен в любую страну. Дикий ПВ серотипа 3 также не обнаруживается в мире уже более 5 лет, что позволяет надеяться и на его глобальное искоренение в ближайшие годы.

Однако в настоящее время серьезную опасность представляют нейровирулентные дериваты вакцинных штаммов всех трех серотипов (так называемые вакцинородственные ПВ), которые приобрели способность вызывать вспышки паралитического полиомиелита. В последние годы число обусловленных ими случаев паралича превышает число случаев классического полиомиелита (2017 г. – 96, 2018 г. – 104), и регистрируются они как в эндемичных, так и в свободных от полиомиелита странах [3].

В Беларуси с мая 2016 г. для иммунизации против полиомиелита прекращено использование живой оральной полиовакцины и используется только инактивированная трехвалентная вакцина (содержит инактивированные штаммы ПВ серотипов 1, 2 и 3). Однако в соседних с нами странах, таких как Россия и Украина, как и во многих других странах мира, наряду с инактивированной полиовакциной продолжает использоваться

живая вакцина, содержащая вакцинные ПВ1 и ПВ3. Учитывая активную миграцию населения, эти вакцинные штаммы могут быть завезены в нашу страну и обнаруживаться как у людей, так и в сточных водах.

Эпидемиологический надзор за полиовирусной инфекцией в Беларуси включает обследование детей в возрасте до 15 лет с полиомиелитоподобными заболеваниями, а также слежение за циркуляцией ПВ среди людей и в сточных водах. Целью настоящего исследования являлся анализ результатов выделения, идентификации и молекулярно-генетического изучения вирусов, полученных в Республике Беларусь в рамках надзора за полиомиелитом в 2015-2018 гг.

Материалы и методы. В период 2015-2018 гг. проведено вирусологическое обследование 231 детей (462 образца стула) в возрасте до 15 лет с синдромом ОВП, выявленных во всех регионах страны. Выполнена идентификация 331 цитопатического агента, выделенного лабораториями областных ЦГЭиОЗ и ЦГЭ г. Минска из сточной воды, образцов стула детей с острыми кишечными инфекциями (ОКИ), детей с другими заболеваниями, здоровых детей в рамках проведения надзора за полиомиелитом и доставленных в Национальный референс-центр по полиомиелиту (93 в 2015 г., 101 в 2016 г., 59 в 2017 г. и 78 в 2018 г.).

Выделение кишечных вирусов проводили в культурах клеток Hep2С, RD, L20В [4]. Серотипирование ПВ выполняли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ типов 1, 2 и 3. Выделение вирусной ДНК/РНК из культуральной жидкости проводили с использованием набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Молекулярную идентификацию ПВ и ЭВ проводили методом одностадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени [5]. Идентификацию аденовирусов проводили методом ПЦР с использованием описанных в литературе праймеров [6]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, рН 8,5 (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА) с добавлением красителя бромистый этидий. Статистическая обработка данных проведена с использованием программы Statistica 10.0 на основе оценки t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В период 2015-2018 гг. из разных источников было выделено 86 ПВ разных серотипов, в том числе 24 ПВ1, 32 ПВ2, 30 ПВ3 (рисунок 1).

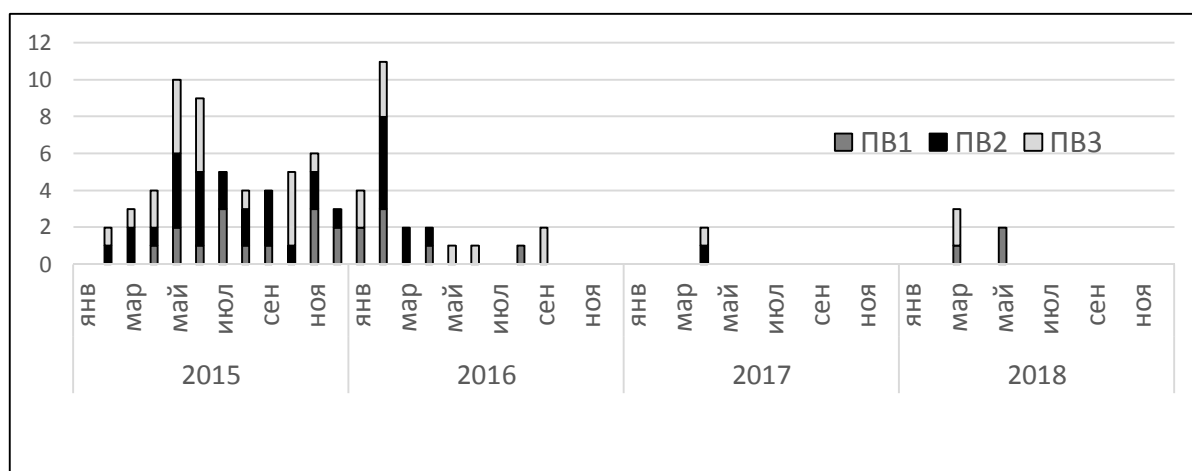


Рисунок 1. – Помесячная динамика выделения ПВ в 2015-2018 гг. в Республике Беларусь

Обследование пациентов с острым вялым параличом. При вирусологическом обследовании 231 пациента с синдромом острого вялого паралича от двух детей были изолированы ПВ (по два штамма из двух образцов стула от каждого ребенка): по одному случаю выделения ПВ2 и ПВ3. ПВ2 был изолирован в мае 2015 г. (рисунок 1), в период

применения в стране оральной полиовакцины, от ребенка, привитого за 5 дней до начала заболевания. Молекулярно-генетическое исследование подтвердило, что вирус являлся вакцинным. Все клинические проявления у ребенка исчезли в течение нескольких дней, и на основании результатов вирусологического и динамического клинического наблюдения случай был классифицирован как ОВП неполиомиелитной этиологии.

ПВЗ был изолирован в сентябре 2016 г., когда вакцинация оральной полиовакциной в Беларуси не проводилась уже около 5 месяцев. При эпидемиологическом расследовании было установлено, что ребенок постоянно проживает в России и получил очередную вакцинацию в форме бивалентной оральной полиовакцины за 56 дней до начала заболевания и прибытия в Беларусь. Молекулярно-генетическое изучение выделенного из проб стула ПВЗ показало, что вирус является вакцинным, а динамическое клиническое наблюдение подтвердило отсутствие связи между вакцинацией и заболеванием ребенка. В 2017-2018 гг. ни одного ПВ от детей с синдромом острого вялого паралича выделено не было. Таким образом, на основании клинических и молекулярно-генетически данных все 231 случай острого вялого паралича были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной природы.

Слежение за циркуляцией полиовирусов в популяции и объектах окружающей среды. При молекулярной и серологической идентификации 331 цитопатических агентов, полученных в проведении надзора за циркуляцией ПВ 2015-2018 гг. во всех регионах страны и доставленных в национальный референс-центр по полиомиелиту, установлено, что 21,5% (71/331) образцов содержали ПВ. После разделения смесей было получено 82 штамма ПВ (рис.1). ПВ были получены из всех источников выделения: 25 из сточной воды, 15 от детей с ОКИ, 14 от детей с ОРИ, 28 от здоровых детей. По результатам молекулярно-генетического исследования все эти вирусы являлись вакцинными.

Основная доля ПВ – 85,4% (70 из 82 штаммов) была выделена в 2015-2016 (январь-апрель) гг., т.е. в период применения в стране живой оральной полиовакцины. В мае-июне 2016 г. получено 2 штамма ПВ от детей без неврологических проявлений, что рассматривается как обычное явление, поскольку длительность выделения вакцинного ПВ привитыми иммунокомпетентными лицами может составлять до двух месяцев. Во второй половине 2016 г., 2017 и 2018 гг. было выделено 3, 2 и 5 штаммов ПВ, соответственно, что достоверно меньше в сравнении с 2015 г. и первой половиной 2016 г. ($p=0,01$).

Во второй половине 2016 г. ПВ были выделены из сточной воды в Гомельской области, в 2017 г. – от здоровых детей из Гродненской области, в 2018 г. – из сточных вод в Витебской области. Вероятнее всего, источником ПВ в последние два с половиной года явились привитые лица, прибывшие в Беларусь из стран, где продолжается применение живой полиовакцины (в число которых входят Россия и Украина). Пока в мире не прекращено использование живых вакцинных ПВ, их редкие заносы на территорию Беларуси, а также ограниченное распространение в популяции возможны. Обнаружение таких вирусов отражает правильную тактику и высокое качество вирусологических исследований в стране. Завоза диких и вакцинородственных штаммов на территорию Беларуси в период 2015-2018 гг. зарегистрировано не было.

Среди цитопатических агентов, полученных в рамках надзора за полиомиелитом, наряду с ПВ, 36,6% составили неполио-энтеровирусы, 36,0% – аденовирусы, 6,6% – нетипируемые (н/т) кишечные вирусы, которые не относились к энтеро- или аденовирусам (рисунок 2). Количество неполио-энтеровирусов, выделенных в рамках надзора за полиомиелитом в разные годы, составило 23 в 2015 г., 27 в 2016 г., 29 в 2017 г., 42 в 2018 г., т.е. возросло в 2018 г. в сравнении с 2015 г. в 1,8 раза (42 против 23) ($p=0,01$). Можно предположить, что циркуляция неполио-энтеровирусов возрастает на фоне резкого снижения поступления в популяцию живых вакцинных ПВ, однако анализируемый период

является недостаточным для того, чтобы оценить складывающуюся ситуацию. Изменения в частоте выделения вирусов могут быть вызваны цикличностью эпидемического процесса инфекции, и для получения окончательных выводов требуются дальнейшие наблюдения.

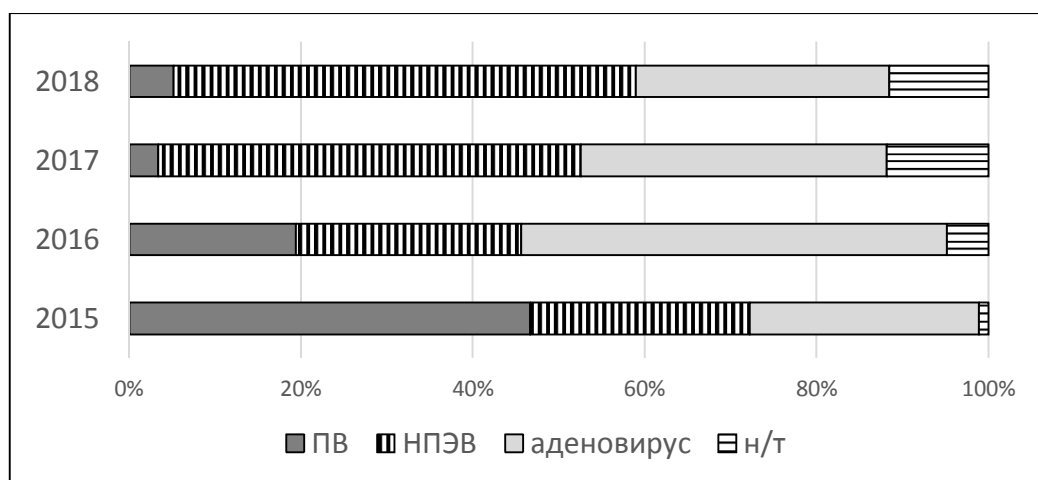


Рисунок 2. – Доля ПВ, неполи-энтеровирусов, аденовирусов и нетипируемых вирусов, выделенных в рамках надзора за полиомиелитом в Республике Беларусь, 2015-2018 гг.

Заключение. Прекращение использования живой оральной полиовакцины (апрель 2016 г.) и применение только инактивированной вакцины для профилактики полиомиелита в Республике Беларусь привели к существенному снижению циркуляции вакцинных ПВ среди населения и в объектах окружающей среды. Если до перехода на инактивированную вакцину в Беларуси из разных источников ежегодно выделялось несколько десятков ПВ всех трех серотипов, то во второй половине 2016 г., 2017 и 2018 гг. были изолированы единичные штаммы и только на ограниченной территории страны (в одной из областей). Все выделенные ПВ являлись вакцинными, диких и вакцинородственных штаммов на территорию Беларуси обнаружено не было.

К настоящему времени все страны мира ввели хотя бы одну дозу инактивированной вакцины в свои национальные календари прививок, однако многие из них по-прежнему продолжают применение живой оральной полиовакцины, которая с мая 2016 г. является двухвалентной и содержит вакцинные штаммы ПВ1 и ПВ3. Живая полиовакцина каждого из трех серотипов, т.е. в том числе и ПВ2, используется для купирования вспышек полиомиелита, обусловленных дикими или вакцинородственными ПВ.

Учитывая высокую миграцию населения, возможны редкие завозы вакцинных, вакцинородственных или диких ПВ на территорию Беларуси. Обнаружение таких вирусов отражает правильную тактику и высокое качество вирусологических исследований, проводимых в стране в рамках надзора за полиомиелитом. Дальнейшее проведение эпидемиологического надзора должно быть направлено на своевременное выявление любых ПВ и недопущение распространения

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения. Полиомиелит. – 3 января 2019 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>. – Дата доступа: 16.09.2019.
2. Polio vaccines: WHO position paper – March, 2016 / Wkly Epidemiol. Rec. – 2016. – Vol. 91, No. 12. – P. 145-168.

3. Global Polio Eradication Initiative. Surveillance Indicators [Electronic resource]. – Mode of access: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/surveillance-indicators/>. – Date of access: 16.09.2019.

4. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. – Женева: ВОЗ, 2005. – 112 с.

5. Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region / I. Casas [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 6176-6182.

6. Алгоритм ускоренной детекции и идентификации полиовирусов с использованием молекулярных методов: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 23.04.2019, рег. номер 001-0419.

DYNAMICS OF POLIOVIRUS ISOLATION AT THE TIME OF DIFFERENT VACCINATION SCHEME AGAINST POLIOMYELITIS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Yermalovich M.A., Samoilovich E.O., Svirchevskaya E.Yu., Ukhava I.F., Semeiko G.V.

Republican Scientific Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

The cessation of live oral polio vaccine (April 2016) and use only inactivated vaccine for the prevention of poliomyelitis in the Republic of Belarus led to a significant decrease in circulation of polioviruses among the population and in environment: from several tens of strains previously detected annually to single strains received in the second half of 2016, 2017 and 2018. (5, 2, and 5, respectively). All isolated polioviruses were vaccine, no wild or vaccine-related strains were found in Belarus. Most likely, the detected polioviruses were imported by recently vaccinated persons from countries where the use of live polio vaccine continues. Detection of such viruses reflects the correct tactics of poliomyelitis surveillance in Belarus.

Keywords: poliovirus, live oral polio vaccine, inactivated polio vaccine

Поступила 18.09.2019

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВИТАМИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ПРОГРАММНОМ ГЕМОДИАЛИЗЕ

¹Карпов И.А., ²Козаченко М.Г.

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Республиканский клинический медицинский центр Управления делами Президента Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Пациенты с хроническими вирусными гепатитами, находящиеся на программном гемодиализе, имеют более выраженный дефицит 25-ОН витамина D по сравнению с пациентами без терминальной стадии хронической болезни почек, имеющими хронический вирусный гепатит (10,5±2,18 нг/мл и 14,9 нг/мл (25-75 перцентили – 13,25-23,47), соответственно (p=0,007)), что свидетельствует о необходимости использования

больших доз витамина D для коррекции его дефицита у данной категории пациентов, а также более тщательного мониторинга его уровня в сыворотке крови при проведении программного гемодиализа у пациентов с хроническими вирусными гепатитами.

Ключевые слова: вирусные гепатиты, гемодиализ, витамины, 25-ОН витамин D.

Введение. Вирусные гепатиты – одна из глобальных угроз общественному здоровью. По новым данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), предположительно 325 миллионов человек в мире живут с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV). По имеющимся оценкам более 13 миллионов человек в Европейском регионе живут с инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (ВГВ), и более 15 миллионов – с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита С (ВГС) [1]. Примерно 10-20% людей с хроническим гепатитом С прогрессируют в цирроз печени в течение 20–30 лет; у 1-5% людей с циррозом печени развивается гепатоцеллюлярная карцинома, а у 3-6% пациентов прогрессирует печеночная декомпенсация в год. Смертность для пациентов с хроническим гепатитом С и печеночной декомпенсацией составляет 15-20% в первый год [2].

В 2015 г. произошло 1,34 миллиона случаев смерти от вирусного гепатита – это число сопоставимо с числом случаев смерти от туберкулеза и ВИЧ, но если смертность от туберкулеза и ВИЧ снижается, то число случаев смерти от гепатита растет. В 2015 г. около 1,75 миллиона человек приобрели инфекцию HCV, а общее число людей, живущих с гепатитом С, достигло 71 миллиона человек. Гепатит В и С являются причиной 96% всех случаев смерти от гепатитов. Генотипы HCV не-1 наиболее часто встречаются в густонаселенных странах Южной Азии, Восточной Азии, Африки и Ближнего Востока. Особая значимость проблемы вирусного гепатита С обусловлена тем, что инфекция может также являться этиологическим фактором целого ряда других серьезных заболеваний, таких как смешанная криоглобулинемия, В-клеточная неходжкинская лимфома, мембранопротрофиеративный гломерулонефрит и ряда других заболеваний [3].

В последние годы во всем мире регистрируется устойчивый рост числа пациентов, находящихся на программном гемодиализе или перитонеальном диализе. Данный феномен в первую очередь связан с увеличением продолжительности жизни пациентов, большей доступностью заместительных процедур и с пересмотром многих критериев, регламентирующих отбор лиц для проведения программного гемодиализа. В целом в Европейском регионе заболеваемость парентеральными гепатитами в центрах хронического гемодиализа составляет 8-9%. По данным различных литературных источников, в отделениях гемодиализа маркеры парентеральных гепатитов суммарно выявляют у 61,4% пациентов (в том числе HBsAg у 11,9%, антитела к HCV у 25%). Наблюдается прямая зависимость частоты выявления маркеров парентеральных гепатитов от длительности пребывания на программном гемодиализе: при продолжительности лечения до 1 года их определяют у 34,8% пациентов, а среди лиц, требующих более длительного применения процедуры (5 лет и более) – 68,8%, антитела к HCV обнаруживают у 17,4% пациентов, находящихся на программном гемодиализе от 1 года, и у 40,6% лиц с продолжительностью лечения 5 лет и более [4].

Целью настоящего исследования было установить особенности обмена ключевых витаминов у пациентов с хроническими парентеральными вирусными гепатитами, находящихся на программном гемодиализе.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на базе отделения гемодиализа учреждения здравоохранения «1-я городская клиническая больница» г. Минска, учреждения здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска и Государственного учреждения «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь в период с июля 2011 г. по апрель 2018 г. Все пациенты с терминальной стадией хронической почечной

недостаточности, включенные в диссертационное исследование, были в возрасте старше 18 лет и находились на программном гемодиализе не менее 12 месяцев. Пациенты с активным воспалительным процессом любой этиологии (кроме вирусного поражения печени), выявленными злокачественными новообразованиями, туберкулезом, аутоиммунным заболеванием (системная красная волчанка, ревматоидный артрит), терминальными стадиями ВИЧ-инфекции (клинические стадии III и IV по Классификации Всемирной Организации Здравоохранения) клинических стадий ВИЧ-инфекции у взрослых и подростков, 2005 [5]) были исключены из исследования. При отсутствии достоверных данных о наличии или отсутствии у пациента, находящегося на программном гемодиализе, критериев исключения этот пациент также исключался из данного диссертационного исследования.

В качестве основной группы были выбраны пациенты отделения гемодиализа учреждения здравоохранения «1 городская клиническая больница» г. Минска, инфицированные парентеральными вирусными гепатитами. В контрольную группу вошли пациенты, находящиеся на диспансерном наблюдении в государственном учреждении «Республиканский клинический медицинский центр Управления делами Президента Республики Беларусь» и учреждении здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска с установленным диагнозом хронического парентерального вирусного гепатита и не находящиеся на программном гемодиализе на момент забора крови на исследование.

Отбор пациентов основной и контрольной групп проводился методом простой случайной выборки с использованием генератора случайных чисел.

В соответствии с вышеизложенными критериями включения и исключения в исследование были включены 22 пациента, проходящих лечение в отделении гемодиализа учреждения здравоохранения «1 городская клиническая больница». Среди пациентов, включенных в исследование мужчины составляли 72,7% (16 человек), женщины – 27,3% (6 человек). Средний возраст пациентов, включенных в исследование особенностей усвоения витаминов у пациентов с хроническими вирусными гепатитами, находящихся на программном гемодиализе, составлял $43,7 \pm 14,1$ года. У 17 пациентов (77,3%), включенных в исследование на данном этапе, был диагностирован хронический вирусный гепатит С, у 2 пациентов (9,1%) – хронический вирусный гепатит В, у 3 пациентов (13,6%) – хронический вирусный гепатит В и хронический вирусный гепатит С.

У пациентов оценивались уровни в сыворотке крови фолиевой кислоты (витамина В9), цианокобаламина (витамина В12), 25-ОН витамина D (основного метаболита витамина D). Уровень витаминов определялся иммунохимическим методом с использованием технологии электрохемилюминесценции (иммунохимический анализатор Cobas e 601, Roche Diagnostics, Germany) с помощью коммерческих тест – систем (Technology Elecsys® ECL, Roche Diagnostics, Germany). Предел обнаружения фолиевой кислоты (витамина В9) – 1,2 нг/мл (2,72 нмоль/л), цианокобаламина (витамина В12) – 100 пг/мл (73,8 пмоль/л), 25-ОН витамина D (основного метаболита витамина D) – 3,0 нг/мл (7,5 нмоль/л). Предел количественного определения уровня фолиевой кислоты (витамина В9) – 2,0 нг/мл (4,54 нмоль/л), цианокобаламина (витамина В12) – 150 пг/мл (111 пмоль/л), 25-ОН витамина D (основного метаболита витамина D) – 5,0 нг/мл (12,6 нмоль/л).

Забор крови у пациентов отделения гемодиализа осуществлялся до проведения процедуры гемодиализа из некатетеризированной вены в систему вакутайнер в объеме 10 мл. Забор крови у пациентов, не находящихся на программном гемодиализе реализовывался из интактной вены в систему вакутайнер в объеме 10 мл. В дальнейшем кровь центрифугировалась в течение 10 минут при 3000 оборотах/мин. Хранение образцов до

проведения анализа осуществлялась при -20°C . Размораживание образцов проводилось однократно непосредственно перед проведением анализа.

За стаж нахождения пациента на программном гемодиализе считалось время от момента первого дня начала лечения программным гемодиализом до взятия крови на исследование.

Для определения достоверности различий между основной и контрольной группой по полу использовался критерий χ^2 (хи-квадрат), возрасту – критерий Манна-Уитни. Оценка достоверности различий по уровням витаминов в сыворотке крови при нормальном распределении признака проводилась с использованием критерия t (Стьюдента); в случае распределения отличного от нормального – с помощью метода Манна-Уитни.

Обработка данных и анализ результатов исследования были проведены с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft®, Соединенные Штаты Америки), Statistica v.10.0 (StatSoft®, Соединенные Штаты Америки), MedCalc v. 13.0.2 (MedCalc Software, Бельгия), Primer of Biostatistics v.4.03 by Stanton A. Glantz (McGrawHill®, Соединенные Штаты Америки).

Результаты всех этапов исследования признавались статистически достоверными, если значение ошибки 1-го рода (p) было меньше 0,05.

Результаты исследования и обсуждение. В группу пациентов с хроническими вирусными гепатитами, находящихся на программном гемодиализе, были включены 5 человек. Среди них 3 пациента (60%) были мужчинами, 2 пациента (40%) – женщинами. Средний возраст пациентов, включенных в данную группу составлял $49,6 \pm 11,1$ года. На момент включения в исследование средняя длительность нахождения на гемодиализе пациентов составляла $16,1 \pm 6,5$ года.

Вторая группа включала пациентов с хроническими вирусными гепатитами, у которых на момент выполнения исследования не было выявлено терминальной стадии хронической болезни почек, требующей нахождения на программном гемодиализе. Среди пациентов, включенных в описываемую группу, мужчины составляли 76,5% (13 человек), женщины – 23,5% (4 человека). Медиана возраста пациентов с хроническими вирусными гепатитами, не имеющих терминального поражения почек, составляла 40,0 лет (25-75 процентиля – 29,0-55,0 лет).

Статистически достоверных различий между двумя группами, включенными в анализ на данном этапе исследования, по полу и возрасту пациентов выявлено не было ($p=0,41$ и $p=0,27$, соответственно).

Среднее значение уровня фолиевой кислоты (витамина В9) в сыворотке крови пациентов с хроническими вирусными поражениями печени, находящихся на программном гемодиализе, составляло $2,53 \pm 0,52$ нг/мл. Среднее значение уровня фолиевой кислоты в сыворотке крови пациентов с хроническими вирусными гепатитами, не имеющих терминальной стадии хронической болезни почек, требующей проведения программного гемодиализа, составляло $2,42 \pm 0,3$ нг/мл. Статистически достоверных различий по уровню витамина В9 в сыворотке крови между пациентами обеих групп, включенных в исследование на данном этапе, выявлено не было ($p=0,87$). При этом необходимо отметить, что среднее значение уровней фолиевой кислоты в сыворотке крови у пациентов с хроническими вирусными гепатитами вне зависимости от нахождения на программном гемодиализе находилось ниже референтных значений, которые составляют для используемого метода диагностики $3,1-20,5$ нг/мл.

Среднее значение уровня цианокобаламина (витамина В12) в сыворотке крови пациентов с хроническим вирусным поражением печени, находящихся на программном гемодиализе, составляло $833,22 \pm 739,12$ пг/мл. Медиана уровня цианокобаламина в группе пациентов с хроническим вирусным поражением печени, не находящихся на программ-

ном гемодиализе, составляла 534,4 пг/мл (25-75 процентиля – 481,6-690,3 пг/мл). Статистически достоверных различий по уровню витамина В9 в сыворотке крови между пациентами с хроническими вирусными гепатитами в зависимости от нахождения на программном гемодиализе, включенных в исследование на данном этапе, выявлено не было ($p=0,85$). Сывороточные уровни цианокобаламина в обеих группах, изучаемых в рамках настоящего этапа исследования, находились в пределах референтных значений, которые для данного диагностического метода составляют 187-883 пг/мл.

Среднее значение уровня 25-ОН витамина D в сыворотке крови у пациентов с хроническими вирусными гепатитами, находящихся на программном гемодиализе, составляло $10,5 \pm 2,18$ нг/мл. Медиана уровня 25-ОН витамина D в сыворотке крови пациентов с хроническими вирусными гепатитами, не имеющих терминальной стадии хронической болезни почек, требующей проведения программного гемодиализа, составляла 14,9 нг/мл (25-75 процентиля – 13,25-23,47 нг/мл). Различия в значениях уровня 25-ОН витамина D между пациентами с хроническим вирусным поражением печени, находящихся на программном гемодиализе и не требующих заместительной терапии функции почек, были статистически достоверны ($p=0,007$). При этом необходимо отметить, что в обеих группах, включенных в исследование на настоящем этапе, наблюдался дефицит уровня 25-ОН витамина D в сыворотке крови (адекватный уровень 25-ОН витамина D в сыворотке крови 30-100 нг/мл), однако в группе пациентов с хроническими вирусными гепатитами, находящихся на программном гемодиализе, отмечался более выраженный дефицит 25-ОН витамина D в сыворотке крови.

Многочисленными исследователями установлено, что между нарушениями метаболизма, гомеостаза и адаптационными возможностями организма существует прямая зависимость. Летальность пациентов, находящихся на гемодиализе, находится в обратной зависимости между количеством потребляемого белка, индексом массы тела и уровнем альбумина крови. Большинство современных авторов отмечает, что смертность в течение первого года нахождения на диализной терапии составляет 15% среди лиц с нормальным индексом массы тела и 39% при низких параметрах данного показателя. Продукты белкового обмена могут быть удалены только почками, для пациентов с терминальной стадией хронической болезни почек характерна склонность к отрицательному азотистому балансу и гиперкатаболизму вследствие анорексии, угнетения синтеза белка и аминокислот, витаминов, микроэлементов [6].

В работах, представленных различными авторами, указывается на дефицит и недостаточность витамина D среди пациентов, находящихся на гемодиализе или перитонеальном диализе [7]. Возможно влияние «мальнутриций-воспалительного» синдрома, который развивается практически у всех пациентов, находящихся на программном гемодиализе и перитонеальном диализе, в течение пяти лет, а также влияние на его прогрессирование хронической HCV-инфекции. Мальнутриция и хронический воспалительный процесс обуславливают развитие у пациентов атеросклеротических изменений, значительно ускоряя атерогенез и последующий риск развития осложнений, чему способствуют повреждения эндотелия, приводящие к повышению его адгезивных свойств по отношению к различным молекулярным рецепторным структурам [8]. Низкий уровень альбумина рассматривается, как независимый фактор развития сердечно-сосудистой патологии и высокой смертности у пациентов отделения гемодиализа. Установлено, что причиной развития гипоальбуминемии у лиц с почечной недостаточностью выступают воспалительный процесс и обменные нарушения. Однако остается не до конца понятным, какой из этих двух процессов оказывает большее влияние на концентрацию сывороточного альбумина. В настоящий момент предполагается, что такие воспалительные биомаркеры, как интерлейкин-6 и С-реактивный белок, являются не только косвенными маркерами, но и медиаторами атеросклероза [9]

В ряде публикаций описана сильная связь между концентрацией С-реактивного белка и сердечно-сосудистой смертностью у пациентов с тяжелым поражением почек. У всех пациентов на диализе повышен уровень провоспалительных цитокинов – ФНО- α , интерлейкинов-1, 6. Провоспалительные цитокины вызывают анорексию, индуцируют резистентность к гормону роста, ИФР-1 и усиливают расход энергии [6]. Интерлейкин-6 стимулирует и регулирует воспалительные, иммунные, метаболические процессы. Он индуцирует синтез белков острой фазы печенью, опосредует, завершает острую фазу воспаления, ингибирует синтез других провоспалительных цитокинов. Интерлейкин-8 обладает хемотаксической активностью, рекрутирует иммунные клетки в очаг повреждения. Служит маркером активации нейтрофилов [9].

Существует определенный параллелизм в понимании закономерностей процессов, происходящих у пациентов с хроническими инфекциями – HCV, HBV. В основе современных взглядов находится представление о комплексном влиянии хронической вирус-ассоциированной инфекции на состояние всех органов и систем организма, приводящее к тяжелой медленно прогрессирующей полисистемной патологии. Огромное значение имеет и возникающая у данной категории лиц стойкая анемия, требующая постоянных трансфузий и, соответственно, повышающая риск возникновения у пациентов парентеральной вирусной инфекции. Некоторые авторы указывают на несколько более легкое течение заболеваний по сравнению с обычной группой пациентов. Это объясняется частичным разрушением вируса на диализной мембране, а также снижением иммунологической реактивности, что особенно характерно при терминальной почечной недостаточности [10].

Заключение. Таким образом, результаты, полученные на данном этапе исследования, указывают на то, что у пациентов с хроническими вирусными гепатитами вне зависимости от нахождения на программном гемодиализе имеется дефицит фолиевой кислоты (витамина B9) и основного метаболита витамина D (25-ОН витамина D), а уровень цианокобаламина (витамина B12) сохраняется в пределах нормальных значений. При этом нахождение пациента с хроническим вирусным поражением печени на гемодиализе приводит к дополнительному снижению уровня основного метаболита витамина D (25-ОН витамина D), что приводит к выраженному дефициту витамина D у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с терминальной стадией хронической болезни почек, находящихся на программном гемодиализе.

Литература

1. Вирусный гепатит: тайный убийца становится явным [Электронный ресурс]. – ВОЗ, 2019. – Режим доступа: <http://www.who.int/publications/10-year-review/hepatitis/ru/>. – Дата доступа: 19.05.2019.
2. Nguyen, D.B. Transmission of hepatitis C virus in the dialysis setting and strategies for its prevention / D.B. Nguyen, D. Bixler, P.R. Patel // *Semin. Dial.* – 2019. – Vol. 32, No. 2. – P. 127-134.
3. Диагноз, ведение и профилактика гепатита С: Глобальные практические рекомендации Всемирной Гастроэнтерологической Организации / Muhammad Umar и др. – 2017 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/Hepatitis_C_russian-2017.pdf. – Дата доступа: 14.09.2019.
4. Вирусные гепатиты у больных с ХПН, находящихся на хроническом гемодиализе – симптомы болезни, профилактика и лечение вирусных гепатитов у больных с ХПН, находящихся на хроническом гемодиализе, причины заболевания и его диагностика [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: <https://www.eurolab.ua/diseases/2102/>. – Дата доступа: 19.05.2019.

5. Лечение и помощь при ВИЧ/СПИДе: Инструкции на методы лечения больных с ВИЧ-инфекцией. – Минск: Глобальный Фонд для борьбы со СПИДом, туберкулезом и малярией, 2008. – 140 с.

6. Амреева, З.К. Нарушения нутриционного статуса у пациентов с хронической болезнью почек / З.К. Амреева // Вестник КазНМУ. – 2018. – № 1. – С. 208-211.

7. Байко, С.В. Витамин Д дефицитные состояния и нарушения фосфорно-кальциевого обмена у детей на диализе и после трансплантации почки: диагностика и лечение / С.В. Байко, А.В. Сукало // Нефрология и диализ. – 2018. – Т. 19, № 4. – С. 478-492.

8. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6? / P. Stenvinkel [et al.] // Kidney Int. Suppl. – 2002. – Vol. 61, suppl. 80. – P. S103-S108.

9. Hepatitis C infection and related factors in hemodialysis patients in china: systematic review and meta-analysis / J. Sun [et al.] // Renal Failure. – 2009. – Vol. 31, No. 7. – P. 610-620.

10. Hepatitis C infection in dialysis patients: a link to poor clinical outcome? / K. Kalantar-Zadeh [et al.] // Int. Urol. Nephrol. – 2007. – Vol. 39, No. 1. – P. 247-259.

THE METABOLIC FEATURES OF VITAMINS IN CHRONIC DIALYSIS PATIENTS WITH CHRONIC PARENTERAL VIRAL HEPATITIS

¹Karpov I.A., ²Kozachenko M.G.

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Clinical Medical Center of the Administration of the President of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Chronic dialysis patients with chronic parenteral viral hepatitis have more significant deficiency of 25-OH vitamin D, compared to patients suffering from chronic parenteral viral hepatitis, but without terminal stages of chronic kidney disease (10.5 ± 2.18 ng/ml and 14.9 ng/ml (25-75 percentiles – 13.25-23.47), respectively ($p=0.007$)). This issue proves necessity for higher vitamin D supplement in case of its deficiency in such patients and for close monitoring of vitamin D serum level in patients with chronic parenteral viral hepatitis during dialysis.

Keywords: viral hepatitis, hemodialysis, vitamins, 25-OH vitamin D

Поступила 17.09.2019

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ БОРРЕЛИЯМИ, ФЛАВИВИРУСАМИ И РИККЕТСИЯМИ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Князева О.Р., Погочкая Ю.В., Красько А.Г., Полещук Н.Н.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. В работе проведен анализ уровня инфицированности иксодовых клещей, отловленных в различных регионах Республики Беларусь *Borrelia burgdorferi sensu lato*, вирусом клещевого энцефалита (*Flavivirus*) и *Rickettsia* spp. Показана достаточно высокая зараженность членистоногих данными трансмиссивными патогенами. Установлено, что их выявляемость в клещах составляет: 31,45% для *Borrelia burgdorferi sensu lato*, 11,54% для вируса клещевого энцефалита и 33,69% для *Rickettsia* spp. Данные показатели с некоторыми колебаниями отмечены на всей территории страны. Это обуславливает значимость проблемы в связи с высокой вероятностью инфицирования населения опасными инфекциями.

Ключевые слова: индикация, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, вирус клещевого энцефалита, *Rickettsia* spp., ПЦР.

Введение. Клещи являются основными переносчиками патогенных трансмиссивных микроорганизмов [1]. За последние 30 лет в мире были выделены и идентифицированы такие возбудители как *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophylum*, *Ehrlichia chaffeensis/ Ehrlichia muris* и зафиксировано множество вспышек переносимых клещами заболеваний [2]. С открытием новых патогенов были получены дополнительные эпидемиологические и экологические данные относительно клещевых заболеваний, наибольшую опасность из которых для человека представляют Болезнь Лайма и клещевой энцефалит. Циркуляция вышеперечисленных патогенов поддерживается в природных очагах, дикими и домашними животными [3]. Питаясь на прокормителях, в крови которых содержатся возбудители, иксодовые клещи – облигатные гематофаги – становятся их депо и переносчиками. Попадая в эту пищевую цепочку, человек является случайным хозяином для этих микроорганизмов [4]. В Республике Беларусь согласно данным официальной статистики заболеваемость болезнью Лайма увеличилась с 8,81 случаев на 100 000 населения в 2009 г. до 21,6 случаев на 100 000 населения в 2018 г. [5]. Истинная частота заболевания, вероятно, недооценена из-за вариабельности в симптоматических диагнозах, недостаточной надежности диагностических тестов и ограниченной эффективности лечения [6]. Клещевой энцефалит, представляющий собой зооноз, вызванный вирусом клещевого энцефалита, принадлежащим к семейству *Flaviviridae*, род *Flavivirus*, является эндемичным заболеванием в зоне, простирающейся от центральной и восточной Европы до Сибири и Японии. Эта инфекция тесно связана с распространением иксодовых клещей *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus*, которые действуют как переносчики и резервуары. В течение последних нескольких десятилетий наблюдается тенденция распространения ВКЭ в ранее не эндемичные регионы [7]. Материалы официальной статистики стран Западной Европы и Российской Федерации свидетельствуют о многократном росте заболеваемости клещевыми риккетсиозами в последние два десятилетия. Однако, на территории Республики Беларусь регистрируются лишь единичные случаи заболеваний, вызываемых патогенными риккетсиями. Это связано с недостаточной настороженностью врачей и необходимостью совершенствования диагностики [8, 9].

В таком контексте, точная информация о зараженности клещей, обитающих на территории Республики Беларусь, сведения об их пространственном распределении и рисках воздействия имеет первостепенное значение для общественного здравоохранения. Обладая этими знаниями, общество может избегать зон повышенного риска и влиять на эпидемическом неблагополучии. Эта информация также должна насторожить медицинское сообщество и способствовать дифференциальной диагностике инфекционных трансмиссивных заболеваний.

Цель работы – оценить инфицированность иксодовых клещей боррелиями, флавивирусами и риккетсиями в природных очагах Республики Беларусь.

Материалы и методы исследования. В весенне-осенние сезоны активности флаговым методом были собраны клещи рода *Ixodes*. на территории всех административных регионов Республики Беларусь в период 2012-2018 гг. Определение видовой принадлежности клещей велось по таблицам Померанцева и Филипповой.

Обработку клеща проводили путем промывания в 70% спирте, затем в стерильном фосфатно-солевом буфере, высушивали стерильной фильтровальной бумагой. Затем клещей гомогенизировали в 150 мкл фосфатно-солевого буфера. Выделение ДНК-РНК проводили с помощью комплекта реагентов Рибо-преп (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкциями изготовителя. к-ДНК получали с использованием набора Реверта-L (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Клещи были проанализированы на наличие вируса клещевого энцефалита, боррелий и риккетсий с использованием набора реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis/E. muris*-FL», или аналогичным набором, BelarTBD-PCR/RT®, производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, в соответствии с инструкцией производителей. Выявление *Rickettsia* spp. осуществляли путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией, согласно стандартному протоколу [10], с использованием праймеров, CS-F (5'-TCG CAA ATG TTC ACG GТАCTT T-3'), CS-R (5'-TCG TGC ATT TCT TTC CAT TGTG-3') и меченого праймера CS-P (5'-6-FAM-TGC AAT AGC AAG AAC CGT AGG CTG GAT G-BHQ-1-3'), соответствующих фрагменту гена цитратсинтетазы (*gltA*).

Результаты и обсуждения. В весенне-осенний период 2012-2018 гг. было исследовано 3 797 клещей *Ixodes ricinus* и *Dermacenter reticulatus*, (635 клещей в 2012 г.; 576 – в 2013 г.; 469 – в 2014 г.; 750 – в 2015 г.; 552 – в 2016 г.; 504 – в 2017 г.; 311 – в 2018 г.). Выделенные из суспензий клещей образцы суммарной ДНК и РНК были проанализированы, с помощью набора «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis/E. muris*-FL», или BelarTBD-PCR/RT®. Для выявления риккетсий использовали стандартный протокол с набором праймеров, соответствующих фрагменту гена цитратсинтетазы (*gltA*).

Установлено, что клещи, отловленные на территории Республики Беларусь, могут быть инфицированы всеми тремя исследуемыми патогенами (рисунок).

Выявляемость *Borrelia burgdorferi* s.l. в клещах, отловленных в различных регионах страны отражена в таблице 1. Процент переносчиков, в которых были идентифицированы боррелии в период 2012-2018 гг. составлял в среднем 31,45%.

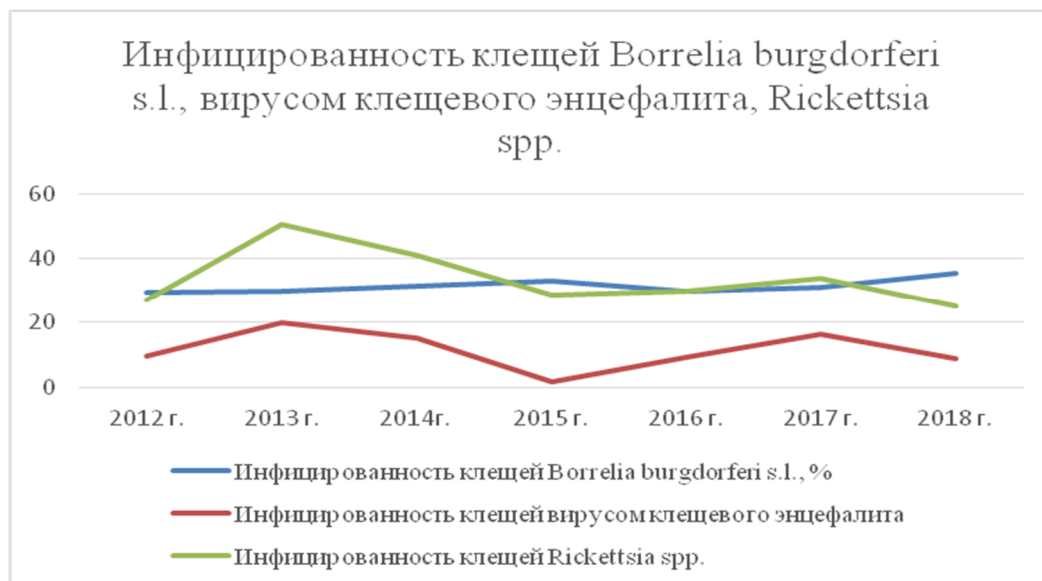


Рисунок. – Инфицированность иксодовых клещей боррелиями, вирусом клещевого энцефалита и риккетсиями

Таблица 1. – Инфицированность иксодовых клещей, *Borrelia burgdorferi* s.l. в сезоны активности 2012 -2018 гг., %

Места сбора клещей, обл.	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l., %						
	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2016 г.	2017 г.	2018 г.
Брестская	44,4	35,29	63,4	47,9	28,8	51,4	34,4
Витебская	40,77	27,5	7,8	54	57,1	36,1	38,5
Гомельская	25,4	26,21	29,4	8,1	47,2	29,2	16,7
Гродненская	41,79	20,18	33,3	29,2	25,5	20,8	39,3
Минская	26,92	35,82	50	36,5	21,2	27,8	40,7
Могилевская	19,51	28,57	21,8	1,5	21,8	19,4	36,7

Для вируса клещевого энцефалита зараженность составила в среднем 11,54% (таблица 2).

Таблица 2. – Инфицированность иксодовых клещей, вирусом клещевого энцефалита в сезоны активности 2012-2018 гг., %

Места сбора клещей, обл.	Вирус клещевого энцефалита, %						
	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2016 г.	2017 г.	2018 г.
Брестская	12,92	18,38	19,5	1,7	9,9	15,3	6,3
Витебская	6,15	5	7,8	2	11,4	22,2	20,5
Гомельская	15,87	17,48	3,9	2	2,8	26,4	8,3
Гродненская	5,9	17,54	33,3	н\о	8,5	12,5	7,1
Минская	12,96	28,36	14,3	1,9	15,8	9,7	20,6
Могилевская	9,76	22,45	12,1	н\о	9,1	23,6	1,7

Средний процент выявляемости риккетсий в клещах составил 33,69% (таблица 3).

Таблица 3. – Инфицированность иксодовых клещей, *Rickettsia* spp. в сезоны активности 2012-2018 гг., %.

Места сбора клещей, обл.	<i>Rickettsia</i> spp., %						
	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2016 г.	2017 г.	2018 г.
Брестская	40,98	58,09	26,8	36,8	44,1	19,4	31,2
Витебская	29,95	65	56,9	24,8	50	47,2	15,4
Гомельская	13,89	23,3	45,1	8,1	42,1	31,9	13,9
Гродненская	11,1	50,88	55,6	37,5	48,9	50	12,5
Минская	15,56	58,21	46,4	26,9	35,6	18,1	18,5
Могилевская	н\о	53,06	29,9	20,3	30,9	26,4	41,7
Всего по Республике	27,08	50,52	41,01	28,7	29,7	33,7	25,1

Резюмируя вышеизложенное, можно отметить значительное, более 30%, число клещей инфицированных боррелиями и риккетсиями. Это делает настоятельно необходимым проведение дальнейших углубленных исследований как моно- так и микст-инфицированности клещей, изменения ареала распространения, напряженности природных очагов и влияния на заболеваемость людей в различных регионах страны. Смешанное инфицирование (присутствие в организме клеща нескольких возбудителей) обусловлено не только этими патогенами, но и выявляемыми в нашей стране и на сопредельных территориях *Coxiella burnetii*, *Borrelia miyamotoi*, *Babesia microti*.

Заключение. Таким образом, нами показана пролонгированная циркуляция патогенных для человека боррелий, вируса клещевого энцефалита и риккетсий в клещах, собранных в природных очагах Республики Беларусь. Высокий процент инфицированности клещей, их распространение на всей территории страны, процессы урбанизации, рост заболеваемости переносимыми клещами инфекциями обуславливают необходимость дальнейшего развития системы эпидемиологического слежения за природно-очаговыми эмерджентными инфекциями, совершенствование диагностики и профилактики, а также значительного внимания лечебной службы к проблеме клещевых инфекций и, особенно, отдаленных последствий инфицирования пациентов. Эффективное решение этих проблем возможно только при кооперации усилий специалистов службы здравоохранения, ветеринаров, зоологов и широкого информирования общества.

Литература

1. Балашов, Ю.С. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций / Ю.С. Балашов. – СПб.: Наука, 1998. – 287 с.
2. Parola, P. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat / P. Parola, D. Raoult // Clin. Infect. Dis. – 2001. Vol. 32. – P. 897-928.
3. Ticks (Ixodida) / W.L. Nicholson [et al.] // In: Medical and Veterinary Entomology: 2nd ed.; eds.: G.R. Mullen, L.A. Durden. – London: Elsevier, 2009. – P. 493-542.
4. Князева, О.Р. Эпидемиологическая ситуация по Лайм-боррелиозу на территории Республики Беларусь в 2011-2013 гг. [Электронный ресурс] / О.Р. Князева, А.Г. Красько // Всерос. науч.-практ. конф. по мед. микробиол. и клинич. микол. (XVII Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 09-11 июня 2014 г.: тез. докл. [Опубл. в журн.] Пробл. мед. микол. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 86-87. – Режим доступа: http://mycology.szgmu.ru/files/МАРО_2_2014.pdf. – Дата доступа: 09.09.2019.

5. Гельминтозы, протозоозы, трансмиссивные зоонозные и заразные кожные заболевания в Республике Беларусь: информ.-аналит. бюлл. за 2009-2018 гг. – Минск: РЦГЭиОЗ, 2010-2018 гг.

6. CDC, 2013. CDC provides estimate of Americans diagnosed with Lyme disease each year. 574 Press Release August 19, 2013 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0819-lyme575disease.html>. – Date of access: 09.09.2019.

7. Stricker, R.B. Lyme disease: the promise of Big Data, companion diagnostics and precision medicine / R.B. Stricker, L. Johnson // *Infect. Drug Resist.* – 2016. – Vol. 9. – P. 215-219. doi: 10.2147/IDR.S114770

8. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks from natural and urban environment, Poland / B. Biernat [et al.] // *Exp. Appl. Acarol.* – 2014. – Vol. 64, No. 4. – P. 543-551. doi: 10.1007/s10493-014-9836-5

9. Virus detection in questing ticks is not a sensitive indicator for risk assessment of tick-borne encephalitis in humans / P. Stefanoff [et al.] // *Zoonoses Public Health.* – 2013. – Vol. 60, No. 3. – P. 215-226.

10. Stenos, J. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae / J. Stenos, S.R. Graves, N.B. Unsworth // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2005. – Vol. 73, No. 6. – 1083-1085.

BORRELIA, FLAVIVIRUSES AND RICKETSIA IN IXODES TICKS IN THE NATURAL FOCI OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Kniazeva O.R., Pogotskaya U.V., Krasko A.G., Poleshchuk N.N.

Republican Research & practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

Ticks are the main transmitters of natural focal vector-borne infections on the territory of the Republic of Belarus and pose a serious threat to human and animal health. The long-term circulation of *Borrelia*, tick-borne encephalitis virus and Rickettsiaceae in ticks collected in natural foci of the Republic of Belarus have been shown. A high percentage of infected ticks (*Borrelia burgdorferi* sensu lato (31.45%), *Rickettsia* spp. (33.69%), tick-borne encephalitis virus RNA (11.54%)) and their widespread throughout the country increases the risk of disease people with Lyme disease, rickettsioses and tick-borne encephalitis, and necessitates antiepidemic and acaricidal measures.

Keywords: indication, PCR, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus, *Rickettsia* spp., Belrus.

Поступила 24.09.2019

ИЗУЧЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ

¹Самойлова Т.И., ¹Красько А.Г., ²Яшкова С.Е., ¹Шипуль В.Н.,
¹Залевская О.С., ¹Климович О.В., ³Цвирко Л.С., ¹Дракина С.А.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь

³Учреждение образования «Полесский государственный университет», Пинск, Республика Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты изучения зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита на территориях Минской, Гомельской и Могилевской областей в 2019г.

Ключевые слова: иксодовые клещи, зараженность, вирус клещевого энцефалита, Минская область, Гомельская область, Могилевская область, Беларусь.

Введение. Среди арбовирусных инфекций наиболее значимой в эпидемиологическом отношении для Республики Беларусь является клещевой энцефалит (КЭ), основным переносчиком возбудителя которого является лесной клещ *Ixodes ricinus*. За последние годы проведения исследований по проблеме КЭ наблюдается тенденция к росту численности переносчиков, повышению уровня их естественной зараженности до 10-15% и выше, расширению ареалов распространения инфицированных клещей по территории Республики Беларусь [1, 2].

Для оценки эпидситуации и изучения закономерностей циркуляции вируса КЭ в природных очагах Республики Беларусь ежегодно проводятся исследования клещей-переносчиков на зараженность их вирусом КЭ. Для изучения вирусофорности клещей в природных очагах в последние годы широко используется экспресс-метод иммуноферментного анализа (ИФА), имеющий высокую чувствительность и не уступающий методу биопробы на животных [3-5].

В данной работе приведены результаты исследования иксодовых клещей, собранных на территориях Минской, Гомельской и Могилевской областей в 2019 г., на выявление антигена вируса КЭ с использованием иммуноферментного метода.

Цель работы – изучение зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита на территориях Минской, Гомельской и Могилевской областей в 2019 г., где ежегодно выявляется вирус в переносчиках.

Материал и методы. Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранные на территориях Минской, Гомельской и Могилевской областей в 2019 г. Перед постановкой ИФА иксодовых клещей подвергали первичной биологической обработке. Предварительно клещи были определены до вида и разложены по биопробам. В одну биопробу брали 5-8 экземпляров голодных или полунапитавшихся самок; 5-8 голодных самцов; 3-5 напитавшихся самок. Далее членистоногих отмывали фосфатным буферным раствором (рН 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии [3]. Приготовленные из клещей суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса КЭ с использованием диагностических наборов фирмы Вектор-БЕСТ (Российская Федерация), согласно инструкции производителя. Всего было исследовано 224 экземпляра (37 биопроб) *I. ricinus* и 114 экземпляров (19 биопроб) *D. reticulatus* из природных очагов.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований иксодовых клещей, собранных в природных очагах, процент выявления антигена вируса КЭ методом ИФА составил: по Минской области – *I. ricinus* 13%, по Гомельской – 11,1%, по

Могилевской – 15,4%. В клещах *D. reticulatus* процент антигена вируса КЭ составил по Минской области – 17,6% (таблица).

Таблица. – Характеристика заражённости иксодовых клещей антигеном вируса клещевого энцефалита в 2019 году

Области	Районы сбора	Виды клещей					
		<i>I. ricinus</i>			<i>D. reticulatus</i>		
		Кол-во экз./б/п	Кол-во полож.	% полож.	Кол-во экз./б/п	Кол-во полож.	% полож.
Минская	Минский, д. Гонолес	25/5			38/7	1	14,3
	Молодеченский, д. Вередово, д. Васьковцы	10/2					
	Стародорожский, г. Старые дороги				26/5	1	20
	Стародорожский, д. Новые фаличи	52/8	2	25			
	Червенский, д. Буденичи				40/5		
Гомельская	г. Светлогорск	15/3	1	33,3			
	Ельский, д. Санюки	28/4					
	Калинковичский	10/2					
Могилевская	Бобруйский	20/3					
	Кировский	20/3					
	Чериковский	28/5	2	40			
	Быховский	16/2			10/2		
Всего		224/37	5	13,5	114/19	2	10,5

Как видно из таблицы в Минской области зараженность *I. ricinus* вирусом КЭ была отмечена в Стародорожском районе (25%), а *D. reticulatus* в Минском (14,3%), Стародорожском (20%) и Червенском районах (20%). В Гомельской области зараженность *I. ricinus* составила 33,3% в г. Светлогорск, в Могилевской области зараженность *I. ricinus* в Чериковском районе составила 40%.

На рисунке приведен процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* и *D. reticulatus* в 2019 г.

Как видно из рисунка наибольшая зараженность отмечалась по Могилевской области у клещей *I. ricinus* (15,4%) и у клещей *D. reticulatus* (11,8%) по Минской области.

Заключение. Учитывая то обстоятельство, что за последние годы определялся высокий процент зараженности клещей *I. ricinus* до 15%, а *D. reticulatus* до 11,6% вирусом КЭ обуславливает необходимость проведения ежегодного эпидемиологического надзора за природными очагами КЭ в республике. Проведенные исследования в 2019 г. показали, что процент зараженности клещей *I. ricinus* по трем областям Республики (Минская, Гомельская, Могилевская) составил 13,5%, а *D. reticulatus* – 10,5%.

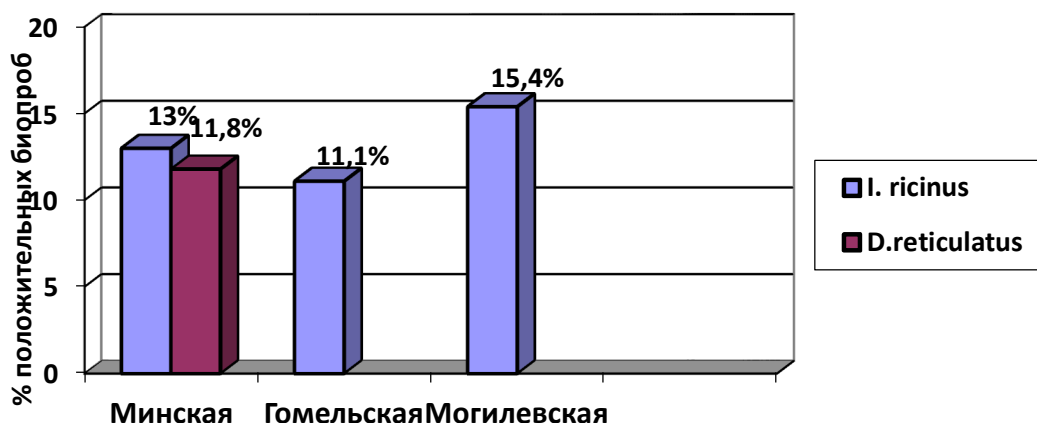


Рисунок. – Данные по выявлению антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* и *D. reticulatus* методом ИФА в 2019 г.

Следует отметить, что 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 // Вест. Уральской гос. мед. академии. – 2010. – Вып. 21. – С. 133-141.
2. Организм иксодовых клещей (*Acarina, Ixodidae*) как среда обитания биоразнообразия патогенных агентов / Н.П. Ишаева [и др.] // Современные аспекты патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики паразитарных заболеваний / под ред. проф. В.Я. Бекиша. – Витебск: ВГМУ, 2014. – С. 140-143.
3. Методические рекомендации по выявлению циркуляции арбовирусов // Итоги науки и техники. Сер. Вирусол. – М.: ВИНТИ, – 1991. – Т. 25. – 111 с.
4. Мельникова, О.В. Вирусологический мониторинг природных очагов клещевого энцефалита в Прибайкалье на основании индивидуального исследования иксодовых клещей: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О.В. Мельникова. – Томск, 1995. – 25 с.
5. 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.

INVESTIGATION OF IXODOIDEA TICK'S INFECTIOUSNESS BY TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN 2019 YEAR.

Samoilova T.I.¹, Krasko A.G.¹, Yashkova S.E.², Shypul V.N.¹, Zaleuskaya O.S.¹, Klimovich O.V.¹, Tsvirko L.S.³, Drakina S.A.¹

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

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

³Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

In the paper the results obtained for studies of ixodes tick's infectiousness with tick-borne encephalitis virus in the territory of the Republic of Belarus in Minsk, Gomel, and Mogilev regions in the season for 2019 are presented.

Keywords: ixodes ticks, infection, tick-borne encephalitis virus, Minsk region, Gomel region, Mogilev region, Belarus.

Поступила 01.10.2019

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ КРОВСОСУЩИХ КОМАРОВ ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ БЕЛАРУСИ

¹Самойлова Т.И., ²Яшкова С.Е., ¹Петкевич А.С., ¹Залевская О.С.,
¹Шипуль В.Н., ¹Климович О.В., ³Цвирко Л.С.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь

³Учреждение образования «Полесский государственный университет», Пинск, Республика Беларусь

Резюме. В статье представлены результаты исследования кровососущих комаров, собранных на территории всех областей Республики Беларусь за период 2016 и 2017 гг., на зараженность их вирусом Западного Нила методами ИФА и ОТ-ПЦР.

Ключевые слова: кровососущие комары, вирус Западного Нила, антиген, ИФА, РНК, ОТ-ПЦР.

Введение. Наряду с возбудителем клещевого энцефалита, наибольшую эпидемиологическую значимость среди арбовирусов для республики имеет вирус Западного Нила (ВЗН) [1, 2], который широко циркулирует на сопредельных с Республикой Беларусь территориях, а также в других странах [1, 3]. Переносчиками вируса являются кровососущие комары, клещи, а также имеются сведения о роли мошек в циркуляции ВЗН [4].

В последние годы ВЗН становится все более агрессивным и вызывает заболевания и эпидемические вспышки даже в тех регионах, в которых он не был ранее известен [5-9]. На территории Беларуси вирус впервые был выделен и идентифицирован в 1985 г. от птиц на весеннем пролете на территории Петриковского района Гомельской области (штамм 48-ЗН Тремля). Позже вирус был изолирован от кровососущих комаров рода *Aedes* и из крови лихорадящего больного (штамм Вин), проживающего на территории Беловежской пуши Брестской области [1].

Ранее нами проводилось изучение зараженности кровососущих комаров и мошек ВЗН с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА). Также проводили выделение вируса на перевиваемой культуре клеток и белых мышах. В этой работе приведены данные не только ИФА, но и выявления ВЗН методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Цель работы – выявление антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах, собранных на территории Республики Беларусь методом ИФА, а также РНК вируса методом ОТ-ПЦР.

Материал и методы. Материалом для исследования служили кровососущие комары, собранные во всех областях республики за период 2016 и 2017 гг. В 2016 г. было взято для исследования 3 307 экземпляров (42 биопробы) 3-х родов: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*. В 2017 г. исследовано 3 992 экземпляра (82 биопробы) также 3-х родов: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*.

Комаров предварительно определяли до рода (С.Е. Яшкова). В биопробу брали по 40-50 экземпляров кровососущих комаров одного рода.

Выявление антигена ВЗН в кровососущих комарах, собранных в 2016 г., определяли методом ИФА. Перед постановкой реакции проводили подготовку биопроб: кровососущих комаров отмывали 70% спиртом, а затем трехкратно фосфатным буферным раствором. Для приготовления суспензии членистоногих тщательно растирали в фарфоровой ступке и к гомогенату добавляли фосфатный буферный раствор из расчета 0,8 мл на 20 комаров и антибиотик. Осветленную надосадочную жидкость использовали в ИФА.

Реакцию ИФА проводили с применением набора реагентов для выявления антигена ВЗН методом ИФА производства института вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва).

Кровососущих комаров, отловленных в 2017 г., исследовали методом ОТ-ПЦР. Перед постановкой реакции ОТ-ПЦР проводили подготовку биопроб аналогично подготовке для постановки в ИФА. Приготовленные из комаров суспензии перед постановкой ОТ-ПЦР хранили при температуре -70°C [6]. Выделение РНК ВЗН проводили с помощью реактивов «РИБО-преп» («Амплисенс», Москва). Амплификацию осуществляли с помощью набора реактивов «АмплиСенс WNV-FL» (Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ результатов амплификации в режиме реального времени учитывали с помощью программного обеспечения, используемого для амплификации прибора CFX96 Realtime system (Bio Rad, USA) [6, 7].

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования кровососущих комаров, собранных в природных очагах республики, позволили выявить зараженность их антигеном ВЗН в ИФА (таблица 1) и РНК вируса методом ОТ-ПЦР (таблица 2).

Таблица 1. – Выявление зараженности кровососущих комаров в 2016 г. антигеном ВЗН в ИФА

Области	Кровососущие комары							
	Всего исследовано		Роды					
			<i>Aedes</i>		<i>Anopheles</i>		<i>Culex</i>	
	экз./б/п	% полож.	экз./б/п	% полож.	экз./б/п	% полож.	экз./б/п	% полож.
Витебская	340/6	16,7	100/1	-	200/2	-	40/3	33,3
Минская	200/4	25	100/3	33,3	-	-	100/1	-
Могилевская	1140/14	7,14	500/5	-	540/7	14,3	100/2	-
Брестская	600/3	-	200/1	-	200/1	-	200/1	-
Гомельская	777/11	9	275/3	-	417/6	16,7	85/2	-
г. Минск	250/4	-	50/1	-	50/1	-	150/2	-
Всего по областям	3307/42	9,5	1225/14	7,14	1407/17	11,7	675/11	9

Примечания: экз. – количество исследованных экземпляров; б/п – число биопроб; % полож. – процент положительных проб.

Как видно из таблицы 1, процент выявления антигена ВЗН в кровососущих комарах за 2016 г. составлял: по Витебской области – 16,7%, по Минской – 25,0%, по Могилевской – 7,14%, по Гомельской – 9,0%. Из Гродненской области комары на исследование не поступали. Зараженность кровососущих комаров ВЗН в целом по областям за 2016 г. составила 9,5%.

Наиболее высокий процент выявления антигена ВЗН отмечен у комаров р. *Anopheles* – 11,7%. В комарах р. *Culex* антиген ВЗН выявлялся в 7,14%, у комаров р. *Aedes* – в 9% (рисунок 1).

Процент зараженности кровососущих комаров по областям ВЗН приведен на рисунке 2.

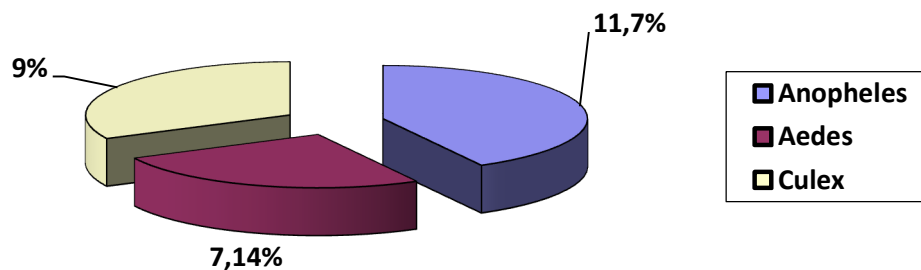


Рисунок 1. – Выявление антигена вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по родам

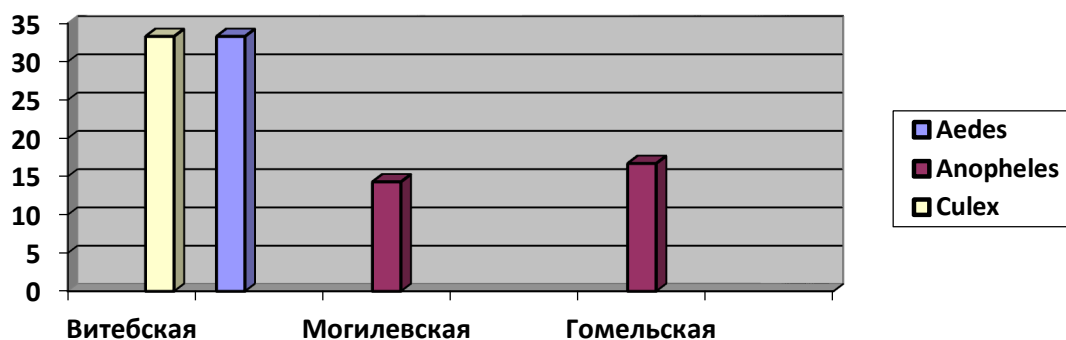


Рисунок 2. – Выявление антигена вируса ЗН в комарах рр. *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* по областям

Как видно из рисунка 2, наиболее высокая инфицированность комаров (по 33,3%) отмечена в Минской и Витебской областях республики. В Гомельской области зараженность кровососущих комаров составила 16,7% и 14,3% в Могилевской области.

Исследования кровососущих комаров по выявлению РНК ВЗН проводилось методом ОТ-ПЦР в 2017 г. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2. – Выявление РНК вируса Западного Нила в кровососущих комарах в 2017 г.

Области	Кровососущие комары		Роды комаров					
	Всего исследовано		<i>Aedes</i>		<i>Anopheles</i>		<i>Culex</i>	
	экз./б/п	% полож.	экз./б/п	% полож.	экз./б/п	% полож.	экз./б/п	% полож.
Витебская	235/8	-	110/4	-	50/2	-	75/2	-
Минская	700/14	7,14	200/4	-	300/6	-	200/4	25
Могилевская	800/16	6,25	350/7	-	200/4	25	250/5	-
Гродненская	517/10	10	217/4	-	-	-	300/6	16,7
Брестская	830/16	-	200/4	-	230/4	-	400/8	-
Гомельская	500/10	20	300/6	16,7	200/4	25	-	-
г. Минск	410/8	-	260/5	-	50/1	-	100/2	-
Всего по РБ	3992/82	6	1637/34	2,9	1030/21	9,5	1325/27	7,4

Как видно из таблицы 2, зараженность кровососущих комаров ВЗН в целом по республике в 2017 г. составила 6%. Процент выявления РНК вируса в кровососущих комарах по областям составил: по Гомельской области 20,0%, по Гродненской – 10,0%, по Минской – 7,14%, по Могилевской – 6,25%.

Если рассматривать зараженность комаров по родам, то наибольший процент выявления РНК ВЗН отмечен у комаров р. *Anopheles* – 9,5%. Процент положительных биопроб кровососущих комаров р. *Aedes* составил 2,9%, р. *Culex* – 7,4% (рисунок 3).

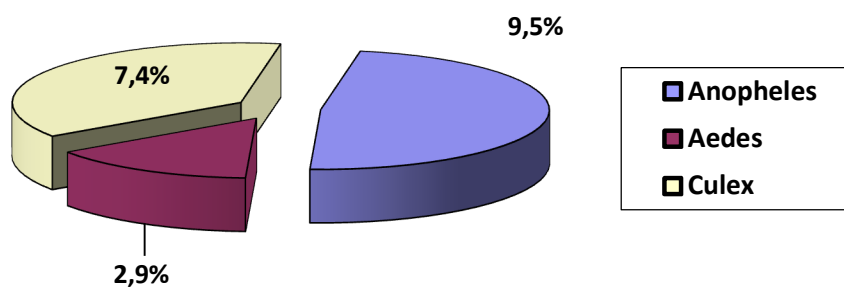


Рисунок 3. – Выявление РНК вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по родам

Заключение. На основании проведенного анализа зараженности кровососущих комаров Беларуси ВЗН за период 2016-2017 гг. можно сделать вывод, что зараженность переносчиков остается на значимом уровне. Исследования комаров в 2016 г. в ИФА позволили выявить их зараженность вирусом в целом по республике 9,5%. РНК ВЗН обнаруживалась в кровососущих комарах в 2017 г. в 6% случаев на территории республики.

Антиген ВЗН в 2016-2017 гг. обнаруживался в кровососущих комарах всех трех исследуемых родов (*Aedes*, *Anopheles* и *Culex*). Наиболее высокий процент (11,7%) в ИФА выявлялся в комарах рода *Anopheles*. Наибольший процент выделения РНК ВЗН отмечался в комарах рода *Anopheles* (9,5%).

Учитывая, что синантропные и полусинантропные роды комаров *Anopheles* и *Culex* обитают поблизости с жильем человека, инфицированные ВЗН переносчики создают угрозу заражения людей этим возбудителем.

Вышеизложенное должно вызвать настороженность со стороны органов здравоохранения и ветеринарной службы республики для усиления мероприятий по эпиднадзору за Западно-Нильской инфекцией.

Литература

1. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в республике Беларусь (полевые и экспериментальные исследования): дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06, 14.00.30 / Т. И. Самойлова. – Минск, 2003. – 257 л.
2. Львов, Д.К. Лихорадка Западного Нила / Д.К. Львов // Вопр. вирусол. – 2000. – № 2. – С. 4-9.
3. Бурлаков, С.А. Комары и клещи – переносчики возбудителей вирусных и риккетсиозных заболеваний человека / С.А. Бурлаков, В.Н. Паутов. – М., 1975. – 215 с.
4. Львов, Д.К. Арбовирусы и арбовирусные инфекции / Д.К. Львов, С.М. Клименко,

С.Я. Гайдамович. – М. Медицина, 1989. – С. 5-6.

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

6. Hubalek, Z. West Nile fever – a reemerging mosquito-born viral disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 5. – P. 643-650.

7. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses / J.S. Mackenzie [et al.] // Nature Med. – 2004. – Vol. 10, No. 12. – P. 98-109.

8. Zeller, H.G. West Nile virus: an 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.

9. Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia / S. Paz [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2013. – Vol. 10. – P. 3543-3562.

10. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов. – М.: Бином. Лаб. знаний, 2009. – 223 с.

11. Херрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / С. Херрингтон, Дж. Макгли; пер. с англ. – М.: Мед. книга, 1999. – 433 с.

MOSQUITOES INFECTED WITH WEST NILE VIRUS IN THE NATURAL FOCI OF BELARUS

¹Samoilova T.I., ²Yashkova S.E., ¹Petkevich A.S., ¹Zaleuskaya O.S., ¹Shypul' V.N.,
¹Klimovich O.V., ³Tsvirko L.S.

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

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

³*Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus*

In this paper results obtained for West Nile virus detection in blood-sucking mosquitoes collected in Belarus in 2016-2017 are presented.

Keywords: blood-sucking mosquitoes, West Nile Virus, antigen, immune-enzyme analysis, RNA, RT-PCR, Belarus.

Поступила 03.10.2019

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РОТАВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОДНОРАУНДОВОЙ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Семейко Г.В., Полякова Н.В., Ермолович М.А., Самойлович Е.О.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Разработан метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени. Метод позволяет выявлять 8 G-генотипов (G1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12) и 5 P-генотипов (P[4], [6], [8], [9], [10]). При выполнении генотипирования каждый исследуемый образец тестируется параллельно в 3 реакциях с использованием 3 панелей праймеров и зондов, исследование выполняется за 3 часа. Исследование 237 клинических образцов с использованием разработанного метода позволило установить G-тип для 99,16% образцов (236 из 238) и P-тип – для 98,74% образцов (235 из 238). Таким образом, разработанный метод характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью и является эффективным для генотипирования ротавирусов, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

Ключевые слова: ротавирус, генотипирование, ПЦР в реальном времени.

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*, геном представлен двухцепочечной сегментированной РНК, кодирующую 6 структурных (VP1-VP4, VP6, VP7) и 6 неструктурных (NSP1-NSP6) белков [1]. По группоспецифическому антигену (VP6) ротавирусы разделяют на семь групп, обозначаемых буквами латинского алфавита от А до G, наибольший интерес в клинической вирусологии вызывают ротавирусы группы А.

Для целей эпидемиологического надзора генотипирование ротавирусов проводится по двум генам: VP7, определяет G-генотип, и VP4, определяет [P]-генотип. На сегодняшний день выявлено 36 различных G-генотипов и 51 P-генотип ротавирусов [2]. Показано, что существуют географические различия в распространенности ротавирусов различных генотипов в разных регионах и даже в рамках одной страны, и частота их встречаемости изменяется со временем.

Среди методов, которые в настоящее время применяются для генотипирования ротавирусов, наиболее широкое применение получила полугнездовая мультиплексная ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции. Этот метод достаточно эффективен, однако является трудоемким, дорогостоящим и затратным по времени проведения исследования. Метод был разработан более 20 лет назад [3, 4], когда данных о генетическом разнообразии ротавирусов было немного, и с течением времени методику приходилось дорабатывать, добавляя праймеры к новым генотипам ротавируса или к новым геновариантам ранее известных генотипов [5]. Как результат, для эффективного типирования ротавирусов метод требует оптимизации в зависимости от страны или региона, где он применяется. При этом данный метод включает три последовательных реакции (обратная транскрипция, первый раунд ПЦР, второй раунд – полугнездовая ПЦР), что предполагает необходимость работы с амплифицированным материалом и, соответственно, определяет высокий риск кросс-контаминации. Перспективным является разработка метода генотипирования ротавирусов с использованием ПЦР в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией, принципиальным преимуществом которого является получение результатов в короткие сроки, упрощение анализа, а также снижение количества манипуляций с исследуемым образцом, и, следовательно, снижение вероятности ошибок.

Целью настоящего исследования явилось разработать метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени и оценить его эффективность.

Материалы и методы исследования. Для подбора условий проведения одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени использовали 7 штаммов ротавирусов дикого типа генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[9], G4P[6], G8P[14], G9P[8], G12P[6] из коллекции лаборатории, их генотип установлен с помощью секвенирования.

Для оценки эффективности разработанного метода использованы образцы стула 237 детей с лабораторно подтвержденным в ИФА (тест-система «РОТА-АГ» производства РНПЦ микробиологии и эпидемиологии) диагнозом ротавирусная инфекция, госпитализированных в инфекционные стационары всех 7 регионов Республики Беларусь в 2017-2018 гг. Их генотипирование выполнено по двум генам (VP4 и VP7) с использованием мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией [6], для определения генотипа нетипируемых ротавирусов использовали секвенирование. Для этих образцов выделение РНК ротавирусов проводили из 10% суспензии проб стула с помощью автоматической системы для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах MagMAX Express (Applied Biosystems, США) с наборами 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США) согласно инструкции производителя.

Для подбора праймеров и зондов для определения G-типа применяли нуклеотидные последовательности VP7-гена референс-штаммов генотипов G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10, G12, для подбора праймеров и зондов для Р-типа – генотипов P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], представленных в базе данных GenBank. Подбор праймеров и зондов выполняли с помощью программы FastPCR. Подобрал праймеры и зонды на эталонных последовательностях референс-штаммов, оценивали их специфичность с различными геновариантами. Всего было проанализировано 2100 нуклеотидных последовательностей VP7 и VP4 гена известных геновариантов, выявленных в период 1983-2016 гг. и представленных в GenBank. Последовательности были выровнены и использованы для редактирования праймеров и зондов (в большую часть праймеров и зондов потребовалось внести вырожденные основания) (таблицы 1-3). Полученные в результате внесенных изменений праймеры были проанализированы на специфичность (чтобы избежать случаев связывания с геномом человека) с помощью ресурса NCBI-Nucleotide blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), оценена вероятность взаимодействия друг с другом, образование шпильчатых структур.

Таблица 1. – Праймеры и зонды для определения G-генотипа ротавируса (панель 1)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
G1-F	ACW TAC CAA TAA CAG GAT CAA TGG A	G1
G1-R	AAT GAI TCR TTC CAK TCA CCA TCA	
G1-P	FAM-TCC AAC WGA AGC AAG TAC TCA AA- BHQ1	
G2-F	GCA TCI GAR TTA GCA GRT CTT A	G2
G2-R	TAC CGT GCA GTC IGT TCC CAT	
G2-P	HEX-CCA TAG GAT TGC ACA GCC A-BHQ1	
G12-F	TGG TTA TGT AAT CCA TGG ACG	G12
G12-R	AAT GTT GYG GAC GTC GGT TGT	
G12-P	Cy3.5-CCC ATT GAT ATC CAT TTA TT-BHQ2	
G8-F	CCA GTT GGC CAY CCT TTT GT	G8
G8-R1	TTG TCA CAC CAT TTG TRA ATT C	
G8-R2	TTG TCA CAC CAT TCG TAA ACT C	
G8-P	Cy5.5-TTC CAY GAA CTA TCW GCT AT- BHQ2	

NSP3-F	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC	Ген NSP3
NSP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	
NSP3-P	Cy5-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-BHQ2	

Таблица 2. – Праймеры и зонды для определения G-генотипа ротавируса (панель 2)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
G3-F	ACG AAC TCA ACR CGA GAG G	G3
G3-R	GTT GCT GCT TCA GTT GGG TAA TA	
G3-P	FAM-TTC CTR ACT TCG ACT TTA TGT TT- BHQ1	
G4-F	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	G4
G4-R	ATC AGA AGC TCC AAC TCA AA	
G4-P	HEX-ATA AAC TGA ACC TGT CGG CC-BHQ1	
G9-F1	CCA TAA ACT TGA TGT GAC TAY AAA TAC	G9
G9-F2	CCA TAA ACT TGA TGT GAC TAC GAG TAC	
G9-R	TGY AGT AGT TGG ATC YGC TGT A	
G9-P	Cy3.5-TCT AAC ACA TCT GAG CCA CC-BHQ2	
G10-F	GAC GAA GCA AAY AAA TGG ATA GC	G10
G10-R	TGA CAT CCT ATY CCT AGY GTT T	
G10-P	Cy5.5-CAT GAT TGT CCC ATY GCT- BHQ2	
NSP3-F	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC	Ген NSP3
NSP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	
NSP3-P	Cy5-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-BHQ2	

Таблица 3. – Праймеры и зонды для определения P-генотипа ротавируса (панель 3)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
P[8]-F	TGG RTT RAC NTG CGG TTC AA	P[8]
P[8]-R	GAC GGT CCT TAT CAG CCT ACT AC	
P[8]-P	FAM-AAT AGT GAC TTT TGG ACT GCA G-BHQ1	
P[4]-F	TCC GCA GTA YTY GAA CTA TCA G	P[4]
P[4]-R	GAC GGA CTY TAA CCT CTA AYA ATA G	
P[4]-P	HEX-TTC ATG GTG AAA CAC CAA CAG-BHQ1	
P[6]-F	TTA ATC CCG GAC CRT TTG C	P[6]
P[6]-R	ACA ACT TGT TGA TTA GTT GGA TTC	
P[6]-P	Cy5-TCA CTT CCC CAT GAC TCC AA-BHQ2	
P[9]-F	TGA GAC MTG YAA TTG GAC ATT TTG	P[9]
P[9]-R	GAA GGR AAA GTT GCT GAA GGT A	
P[9]-P	Cy3.5-AAG RCA ATA CGT ATT AGA TGG-BHQ2	
P[10]-F	CTG ACC ACC GTG CTT CAT TA	P[10]
P[10]-R	TGA AAA CCA CRT CAT CAG GAA	
P[10]-P	Cy5.5-TAT CAG AGC CAA AAC TCT ATG G-BHQ2	

ОТ-ПЦР в реальном времени выполняли с использованием коммерческого набора Superscript III Platinum One-Step qRT-PCR (Invitrogen, США) в объеме 25 мкл на амплификаторе CFX96 (BioRad, США). Для проведения реакции готовили 3 смеси праймеров и 3 реакционные смеси, содержащие зонды и ферменты. В пробирку, содержащую смесь праймеров (по 15 мкМ каждого из праймеров соответствующей панели, общий объем смеси – 7,5 мкл) вносили по 2 мкл вирусной РНК, инкубировали 5 мин при 95°C, а затем

быстро охлаждали на льду. Затем вносили по 15,5 мкл реакционной смеси, содержащей по 5 мкМ соответствующих зондов, 12,5 мкл 2X буфера и 0,5 мкл ферментов, и инкубировали в следующих условиях: обратная транскрипция – 20 мин при 50°C, активация ДНК-полимеразы – 2 мин при 95°C, 45 циклов амплификации: 15 с при 95°C / 1 мин при 60°C.

Результаты исследования и обсуждение Генотипический пейзаж, характерный для Европейского региона в целом, типичен и для Республики Беларусь, и более чем на 90% представлен 5 генотипами (G4P[8], G1P[8], G9P[8], G2P[4], G3P[8]) [7]. Результаты собственных исследований, а также данные литературы показывают, что наряду с ними выявляются вирусы генотипов G12P[6], G4P[6], G3P[9], G8P[4], G8P[6], G10P[8] и G4P[10], в ряде стран их доля в циркуляции доходит до 18-20%. Таким образом, наиболее целесообразный перечень генотипов для детекции представляется следующим: P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] и G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10, G12.

Максимальное число флуорофоров, которое может эффективно регистрироваться и корректно распознаваться в ходе ПЦР в реальном времени, составляет 5 (FAM, HEX, Cy3.5, Cy5, Cy5.5). Исходя из этого для распознавания такого широкого спектра генотипов разработаны 3 панели пентаплексных реакций (таблицы 1-3). Первая и вторая панель содержат праймеры для детекции 8 G-генотипов (по 4 генотипа в панели), также каждая из них включает праймеры для детекции NSP3 гена ротавируса, который выполняет роль внутреннего контроля и позволяет идентифицировать наличие РНК ротавируса в каждой исследуемой пробе. В том случае, если G-генотип не соответствует ни одному из вышеперечисленных, детекция сигнала по NSP3 гену будет свидетельствовать о том, что проба все-таки ротавирус-положительная, а для его типирования необходимо применить другой метод (например, секвенирование). Третья панель содержит праймеры для определения 5 P-генотипов. Каждому генотипу в панели соответствует свой флуорофор. Таким образом, при выполнении генотипирования каждый исследуемый образец тестируется параллельно в 3 реакциях с использованием 3 панелей праймеров и зондов. Благодаря использованию набора для одностадийной ОТ-ПЦР, реакция выполняется за 3 часа. Исследование 7 лабораторных штаммов позволило оптимизировать состав и параметры реакции.

С целью сравнения разработанного метода одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени с полугнездовой ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией была подготовлена панель ротавирусов, включающая 237 образцов. Панель содержала образцы 12 генотипов: G3P[8] (125), G2P[4] (41), G4P[8] (18), G9P[8] (16), G1P[8] (15), G3P[9] (8), G3P[4] (3), G12P[6] (2), G9P[4] (2), G4P[6] (1), G4P[4] (1), G2P[8] (1). В 4 образцах присутствовали смеси ротавирусов нескольких генотипов: G2+G3P[4]+P[8], G2[4]+P[8], G3P[4]+P[8], G9P[4]+P[8].

При исследовании с использованием разработанного метода G-тип корректно установлен для 99,16% исследуемых образцов (236 из 238) и P-тип – для 98,74% образцов (235 из 238). Не удалось определить генотип G в 2 образцах (G1) и генотип P в 3 образцах (P[6] – 2, P[9] – 1). Следовательно ротавирусы генотипов P[4], P[8], G2, G3, G4, G9, G12 типировались со 100% эффективностью.

Неудачи в типировании 2 образцов генотипа G1 вполне допустимы из-за большого разнообразия геновариантов генотипа G1, как самого широко распространенного в мире. Сложности с определением P-типа в образцах G12P[6], G3P[9] и G4P[6] также вполне возможны, поскольку нередко выявляемые у людей ротавирусы генотипа P[6] и P[9] имеют животное происхождение (ротавирусы кошек, овец, коров и др.) и в сравнении с вирусом человека содержат значительную долю нуклеотидных замен в соответствующем гене, в результате их генотип не удастся определить с помощью ПЦР и требуется применять секвенирование. Ротавирусы генотипа G12P[6], G3P[9] и G4P[6] в данном исследовании были типированы без применения секвенирования, только с помощью “классической” ПЦР. Однако при использовании ПЦР в реальном времени, когда

должно произойти комплементарное связывание и праймеров, и зонда, при типировании таких штаммов чувствительность метода будет снижена. Стоит отметить, что всего в исследуемой панели присутствовало 8 вирусов генотипа P[9] (G3P[9]), среди которых 7 были типированы корректно (87,5%), и 3 вируса генотипа P[6] (2 – G12P[6] и 1 – G4P[6]), среди которых 1 типирован корректно (33,3%). Это свидетельствует о том, что метод позволяет определять генотипы G1, P[6] и P[9], хотя и с менее чем 100% эффективностью.

Заключение Проведенное исследование свидетельствует о том, что разработанный метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью и является эффективным для генотипирования ротавирусов, циркулирующих на территории Республики Беларусь. Его внедрение в практическое здравоохранение позволит проводить мониторинг циркулирующих генотипов ротавирусов, который послужит важной основой для оценки эффективности внедрения вакцинации против ротавирусной инфекции в Республике Беларусь. Разработанный метод представлен в виде инструкции по применению «Метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени» (от 20.06.2019 № 005-0519).

Литература

1. Estes, M.K. Rotaviruses / M.K. Estes, A.Z. Kapikian // In: Fields Virology: 5th ed.; eds.: D.M. Knipe [et al.]. Philadelphia: Lippincott, 2007. – P. 1917-1974.
2. RCWG. Rotavirus Classification Working Group: RCWG–Laboratory of Viral Metagenomics Electronic resource]. – Mode of access: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/newgenotypes/>. – Date of access: 19.09.2019.
3. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India / B.K. Das [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1994. – Vol. 32, No. 7. – P. 1820-1822.
4. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol. 30, No. 6. – P. 1365-1373.
5. Manual of Rotavirus Detection and Characterization Methods. – Geneva: WHO, 2009. – 145 p.
6. Метод определения генотипа ротавирусов группы А с использованием мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 17.02.2017 № 001-0217 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.belriem.by/images/docs/instruction_main/001-0217_17.02.2017.pdf. – Дата доступа: 19.09.2019.
7. Ротавирусная инфекция в Республике Беларусь / Н.В. Полякова [и др.] // Здравоохранение. – 2017. – № 7. – С. 12-19.

ESTIMATION OF EFFICIENCY OF MULTIPLEX ONE-STEP REAL TIME RT-PCR ASSAY FOR ROTAVIRUS GENOTYPING

Semeiko G.V., Polyakova N.V., Yermalovich M.A., Svirchevskaya E.Iu., Samoilovich E.O.

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

Multiplex one-step real-time RT-PCR assay for genotyping of rotaviruses has been developed. This method allows to identify 8 G-genotypes (G1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 12) and 5 P-genotypes (P [4], [6], [8], [9], [10]). To determine genotype each sample is tested in parallel in 3 reactions using 3 panels of primers and probes, the study is completed in 3 hours. The assay was evaluated with 237 clinical samples and was able to assigned correctly G-type for 99.16% of samples (236 of 238) and the P-type for 98.74% of the samples (235 of 238). Thus, the developed method is characterized by high specificity and sensitivity and is effective for genotyping rotaviruses circulating in the Republic of Belarus.

Keywords: rotavirus, genotyping, real-time RT-PCR.

Поступила 19.09.2019

ИММУНОЛОГИЯ

Оригинальные исследования

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ ШТАММА ВНУКОВО-32, ПРИМЕНЯЕМОГО ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ АНТИРАБИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ ОЧИЩЕННОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СУХОЙ

¹Антонова Л.П., ¹Каа К.В., ²Самарцева Т.Г., ³Оксанич А.С.,
¹Мосолова С.В., ¹Игнатъев Г.М.

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова», Москва, Российская Федерация

²Научно-исследовательский Институт Вакцин и Сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Российская Федерация

³ЗАО БТК «Биосервис», Боровск, Российская Федерация

Резюме. Как и для других РНК-вирусов, геному вируса бешенства свойственна высокая эволюционная изменчивость. В настоящем исследовании были изучены на предмет генетической стабильности нуклеотидные последовательности фрагмента гена G, выделенного из производственного штамма Внуково-32, готовых серий вакцины антирабической, изготовленных в 2012 и 2018 годах, штамма фиксированного бешенства CVS, используемый для оценки специфической активности. Была показана возможность применения рестрикционного анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины.

Ключевые слова: бешенство, ген G, генетическая стабильность, Внуково-32.

Введение. Вирус бешенства относится к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Геном представителей рода представляет собой несегментированную одноцепочечную РНК (“–” цепь) длиной около 12 тыс. н., кодирующую пять белков: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L).

Род *Lyssavirus* содержит 7 генотипов и несколько частично изученных изолятов вируса, предположительно представляющие новые генотипы [1]. Соответствие генотипов видам вируса бешенства показано в таблице 1.

Таблица 1. – Виды, включенные в род *Lyssavirus*, их первичные хозяева, распространение и соответствие генотипам

<i>Принятые и предполагаемые виды</i>	<i>Выявленные первичные хозяева</i>	<i>Описанные области распространения</i>	<i>Генотип</i>
Rabies virus (RABV)	Хищники и летучие мыши	Везде кроме Австралии и некоторых островов; летучие мыши – только в Америке	1
Lagos bat virus (LBV)	Летучие мыши (<i>Pteropus spp.</i> , <i>Saccolaimus albiventris</i>)	Африка (суб-Сахара)	2
Mokola virus (MOKV)	Неизвестен	Африка (суб-Сахара)	3

<i>Продолжение таблицы 1</i>			
Duvenhage virus (DUVV)	Насекомоядные летучие мыши	Африка (суб-Сахара)	4
European bat lyssavirus, type 1 (EBL1)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Eptesicus serotinus</i>)	Большая часть Европы (от Испании до Украины)	5
European bat lyssavirus, type 2 (EBL2)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis daubentonii</i> , <i>M. dasycneme</i>)	Северо-Западная Европа	6
Australian bat lyssavirus (ABLV)	Летучие мыши (<i>Pteropus spp.</i> , <i>Saccolaimus albiventris</i>)	Австралия	7
Khujand virus (KHUV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis mystacinus</i>)	Центральная Азия	-
Aravan virus (ARAV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis blythi</i>)	Центр. Азия	-
Bokeloh bat lyssavirus (BBLV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis nattereri</i>)	Франция, Германия	-
Irkut virus (IRKV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Murina leucogaster</i>)	Восточная Азия	-
Shimoni bat virus (SHIBV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Hipposideros commersoni</i>)	Кения	-
West Caucasian bat virus (WCBV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Miniopterus spp.</i>)	Юго-Восточная Европа	-
Ikoma lyssavirus (IKOV)	Неизвестны	Танзания	-

Подавляющее большинство случаев заболевания бешенством как человека, так и животных вызывается вирусами, относящимися к генотипу 1. Вирусы остальных установленных и предложенных генотипов либо обнаруживались лишь эпизодически у больных людей и наземных животных, либо найдены только у летучих мышей. Штаммы, используемые для производства вакцин (SAD-Bern, SAD-B19, ERA, SAG, SAG2, Flury, Pitman Moore), так же относятся к генотипу 1 [2].

Как и для других РНК-вирусов, геному вируса бешенства свойственна высокая эволюционная изменчивость. Это связано с тем, что вирусная РНК-полимераза не обладает корректирующей 3'-экзонуклеазной активностью, что приводит к повышенному уровню возникновения нуклеотидных замен при репликации вирусного генома. Небольшие различия в нуклеотидных последовательностях отдельных представителей одного штамма могут быть обнаружены как для вирусов, выделенных из одного зараженного организма, так и выделенных из одного образца вакцины [2]. Частота возникновения спонтанных однонуклеотидных замен в случае вируса бешенства особенно высока в последовательности гена G ($21,9 \times 10^{-4}$ мутаций на основание). Для сравнения, в последовательности гена N эта частота значительно ниже – $2,9-3,7 \times 10^{-4}$. Вероятно, повышенный уровень изменчивости гена G, кодирующего основной антиген, важен для вируса бешенства, помогая ему быстрее адаптироваться к различным хозяевам [3]. Таким образом последовательность гена белка гликопротеина является высоковариабельной и может использоваться для контроля генетической стабильности. Кроме этого, белок гликопротеина содержит иммуногенные эпитопы, которые обеспечивают формирование иммунитета [4]. Нуклеотидная структура данных эпитопов известна [5], поэтому контроль генетической стабильности одновременно позволяет контролировать стабильность (сохранность, наличие) иммуногенных эпитопов.

Материалы и методы исследования. В исследовании были использованы производственный штамм Внуково-32, готовые серии вакцины антирабической 561, 962 (серии были приготовлены в 2012 и 2018 гг.), штамм фиксированного бешенства CVS, используемый для оценки специфической активности. Выделение вирусной РНК из указанных образцов, структура праймеров, использованных для реакции обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), проведение реакции обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции описано в приведенных ниже пунктах 1, 2, 3, 4 соответственно. Анализ каждого из образцов проводился в трех повторах.

1. Расчет праймеров

После проведения анализа первичной структуры полноразмерных последовательностей вирусов бешенства для определения вариабельных и консервативных участков генома, нами был произведен выбор нуклеотидных маркеров для подтверждения подлинности вакцинного штамма Внуково-32.

На основании полученных данных нами был проведен выбор области для амплификации и подбор праймеров. Структура использованных в работе праймеров и их характеристики приведены в таблице 2.

Таблица 2. – Структура праймеров

<i>Праймер</i>	<i>Структура</i>	<i>Длина</i>	<i>Расчетная T отжига</i>
RabF	5' GGTAGTGGAGGACGAAGGATGC 3'	22 н.	58,4°C
RabR	5' CGCAAGTCTCACTCCCTTTGGA 3'	22 н.	60,1°C

При компьютерном анализе последовательности сконструированных олигонуклеотидов не образовывали стабильных вторичных структур в виде шпилек (в них отсутствовали протяженные палиндромные последовательности) и термодинамически стабильных гомо- и гетеро- (с соответствующим парным олигонуклеотидом) димеров. Синтез праймеров был проведен в ЗАО БТК «Биосервис».

2. Выделение РНК и Обратная транскрипция

РНК из образцов выделяли набором «АмплиПрайм РИБО-преп» производства ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, согласно прилагаемой инструкции.

Обратная транскрипция проводилась с помощью MMLV-ревертазы (Синтол, Е-040) в соответствии с инструкцией производителя. Объем каждой реакционной смеси составлял 10 мкл.

3. Секвенирование

Секвенирование ПЦР-продуктов с расчетной длиной 539 п.н. проводилось на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (ABI, США) с использованием праймеров, использовавшихся для амплификации. Последовательность каждого из фрагментов была расшифрована с прямого и обратного праймера, полученные первичные структуры проверены на отсутствие разночтений и полиморфизмов и объединены в программе Vector NTI 9.1 с помощью функции ContigAssembler.

4. ПЦР и ПДРФ анализ

ПЦР проводили с помощью набора ПЦР-Микс (Синтол, М-428) в соответствии с инструкцией производителя.

В реакции рестрикции брали по 5 мкл раствора ДНК, полученного на станции ПЦР. Реакции проводили в условиях, рекомендуемых производителем ферментов PvuII (ООО

«СибЭнзайм», E112) в течение 1,5 часов. Объем каждой реакционной смеси составлял 10 мкл. Продукты гидролиза разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле и после обработки раствором бромистого этидия визуализировали в УФ-свете.

Результаты исследования. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена G из представленных образцов.

1. Штамм Внуково-32

В результате исследования при амплификации РНК, выделенной из всех указанных образцов, был получен фрагмент с расчетной длиной 539 п.н. Нуклеотидная последовательность штамма Внуково-32 представлена ниже на рисунке 1.

GTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCC-
TACATGGAACTTAAAGTTGGATACATCTCAGCCATAAAAATGAACGGGTTAC-
TTGCACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTA ACTTCGTT-
GGTTATGTCACAACCACGTTCAAAAAGAAAGCATTTCCGCCCAACAC-
CAGATGCATGTAGAGCCGCGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAG-
TATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTACAGCTGGCTTCGAACTG-
TAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGTTTT-
GGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGG-
GAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGAT-
TACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTT-
GTGACATTTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGA-
GACTTGC

Фрагмент соответствует позициям 3458–3996 генома вируса бешенства.

CAGCTG сайт рестрикции рестриктазой PvuII.

Рисунок 1. – Нуклеотидная последовательность штамма Внуково-32

Было произведено множественное выравнивание фрагментов гена G вируса бешенства штамма Внуково-32 (производственный штамм и готовые серии) и ряда известных вакцинных штаммов и показано отсутствие отличий в нуклеотидной последовательности штамма Внуково-32, полученной как из производственного штамма, так и из готовых серий, выпущенных в разные годы. Это позволяет предполагать генетическую стабильность штамма Внуково-32 как минимум по изучаемому фрагменту на этапах производства вакцины.

На основании полученных данных составлена таблица 3, указывающая выявленные межштаммовые различия.

Таблица 3. – Различающиеся нуклеотиды в изучаемом фрагменте гена G у штамма Внуково-32, других вакцинных производных штамма SAD и референсного штамма вируса бешенства RABV ref

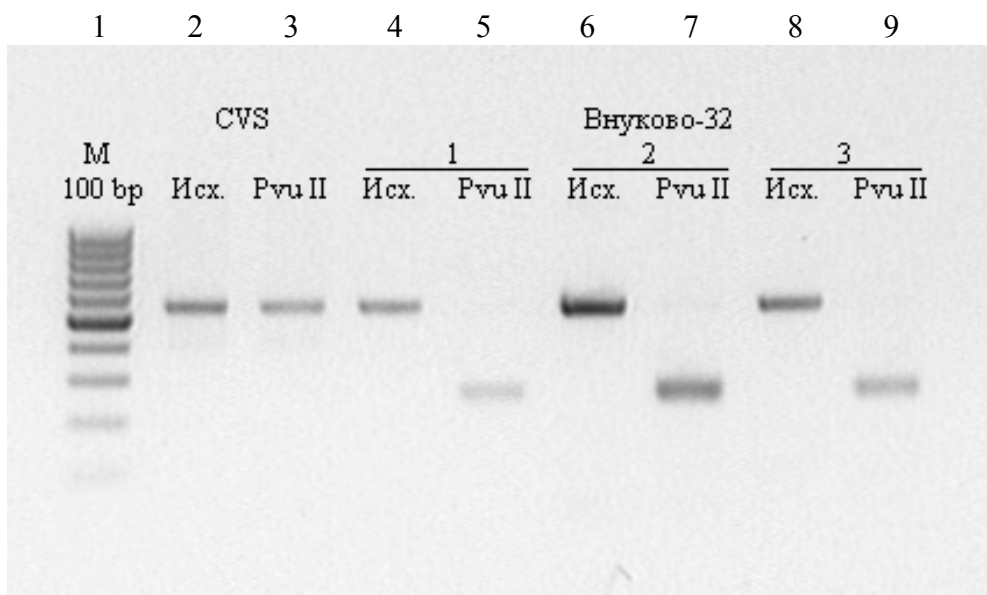
Штамм \ Позиция	Vnuk32	V32 962	V32 521	ERA	ERA- VC	SAG- 2	SAD- B19	SAD- Bern	RABV ref
3528	C	C	C	T	T	T	T	T	C
3539	A	A	A	A	A	G	G	A	A
3582	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3634	C	C	C	C	C	C	C	C	C
3731	A	A	A	C	C	C	C	C	C
3732	G	G	G	G	G	G	G	G	A
3790	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<i>Продолжение таблицы 3</i>									
3795	T	T	T	A	A	A	A	A	A
3839	A	A	A	A	A	A	A	A	G
3847	G	G	G	G	G	G	G	G	T
3918	A	A	A	A	A	A	A	G	A
3932	A	A	A	A	A	A	A	G	A
Число отличий от Vnuk 32	-	-	-	3	3	4	4	5	5

Примечания:

1. Серым фоном выделены нуклеотиды, отличающиеся от таковых в последовательности Внуково-32.

2. Позиции нуклеотидов даны по геномной последовательности референсного штамма.

Проведенный анализ показывает, что штамм Внуково-32, используемый для производства, отличается от близких к нему штаммов, что позволяет проводить его идентификацию, исходя из нуклеотидного состава выбранной части генома. Анализ последовательностей штамма Внуково-32 и других вакцинных штаммов показал, что ген белка G штамма Внуково-32 содержит сайт рестрикции CAGCTG рестриктазой PvuII. Другие штаммы не имеют такого сайта. В связи с этим появляется возможность подтверждения подлинности штамма Внуково-32 на всех этапах производства и в готовой форме с использованием молекулярно-генетических методов. Использование указанной рестриктазы позволяет «разрезать» амплифицированный фрагмент 539 п.н. с образованием двух фрагментов 276 п.н. и 263 п.н. В случае использования кДНК штамма Внуково-32 визуальным результатом гидролиза будет выглядеть одной выраженной полосой. В случае других штаммов (в нашем случае CVS – реакция не пройдет и фрагмент останется той же длины – 539 п.н. Результаты проведенного ПДРФ-анализа представлены на рисунке 2. Как видно на рисунке, при проведении гидролиза рестриктазой PvuII с кДНК штамма CVS в связи с отсутствием сайта рестрикции у данного штамма реакция не прошла, в то время как у образцов штамма Внуково-32 отмечается четкое разделение амплифицированного фрагмента на два.



Дорожка 1 – М, маркер длин фрагментов ДНК (SE 100bp, СибЭнзайм, М15); дорожки 2, 3 – штамм CVS, 2 – продукт амплификации 539 п.н., 3 – результат гидролиза – 539 п.н.; дорожки 4-9 – штамм Внуково-32; дорожки 4-5 – производственный штамм, 4 – фрагмент до гидролиза, 5 – после гидролиза; дорожки 6-7 – серия 561, 6 – фрагмент до гидролиза, 7 – после гидролиза; дорожки 8-9 – серия 962, 8 – фрагмент до гидролиза, 9 – после гидролиза.

Рисунок 2. – Продукты гидролиза амплифицированного фрагмента гена G из препаратов РНК образцов штаммов вируса бешенства

2. Штамм CVS

В результате исследования при амплификации РНК выделенной из 10% мозговой суспензии образцов был получен фрагмент с расчетной длиной 539 п.н. Нуклеотидная последовательность штамма CVS представлена ниже на рисунке 3.

GTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACATGGAAC
CAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAAAGTGAACGGGTTCACCTTGCACAGGTGTT
GTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTTGGTTATGTCACAACCACATTCA
AGAGAAAGCATTTCCGCCCCACCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGA
AGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATACCCCGACTA
CCACTGGCTTCGAACTGTAAGAACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCA
AGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAAATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTG
GCGGAAAATGCTCAGGAATAACGGTGTCTCTACCTACTGCTCAACTAACCATGA
TTACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACCAAGGACACCTTGTGACATTTTT
ACCAATAGCAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGC

Рисунок 3. – Нуклеотидная последовательность штамма CVS. Фрагмент соответствует позициям 3458–3996 генома вируса бешенства

Анализ нуклеотидной последовательности вируса бешенства штамма CVS свидетельствует о том, что она полностью гомологична нуклеотидным последовательностям штаммов CVS, представленных в открытом доступе в GenBank. В базе данных GenBank представлены последовательности штаммов CVS, полученные разными исследовательскими группами. При этом необходимо отметить полную последовательность штамма CVS, представленную Национальным институтом контроля фармацевтических и биоло-

гических препаратов (КНР) с указанием источника получения штамма, последовательность от Института Биологических стандартов (Индия). Отсутствуют данные о штамме CVS, используемого в НЦЭСМП (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России).

По своей нуклеотидной последовательности штамм CVS вируса бешенства, используемый в Центре им. М.П. Чумакова для контроля специфической активности, гомологичен последовательностям штаммов CVS используемых в мире. Не содержит сайт рестрикции PvuII характерный для штамма Внуково-32.

Заключение. Основные выводы данного исследования:

1. Штаммы Внуково-32 и CVS, используемые в Центре им. М.П. Чумакова являются вирусами бешенства.

2. В части изученной нуклеотидной последовательности штамм CVS гомологичен нуклеотидным последовательностям штаммов CVS, используемых в других странах.

3. По исследованной нуклеотидной последовательности штамм Внуково-32 стабилен на этапах производства.

4. Полученная нуклеотидная последовательность гена G штамма Внуково-32 направлена для депонирования в GenBank.

5. Возможно применение рестрикционного анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины.

Литература

1. Family *Rhabdoviridae* / R.G. Dietzgen [et al.] // In: Virus taxonomy: 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / eds.: A.M.Q. King [et al.]. – Oxford: Elsevier, 2011. – P. 686-714.

2. Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife / L. Geue [et al.] // Vaccine. – 2008. – Vol. 26. – P. 3227-3235.

3. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts / B. Kissi [et al.] // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80, pt. 8. – P. 2041-2050.

4. Metlin, A. Genetic characteristics of field and attenuated rabies viruses and molecular epidemiology of rabies in Finland and Russia: ac. diss. / Metlin, A. – University of Helsinki, 2008.

5. Conservation of binding epitopes for monoclonal antibodies on the rabies virus glycoprotein / N.A. Kuzmina [et al.] // J. Antivir. Antiretrovir. – 2013. – Vol. 5, No. 2. – P. 037-043. doi: 10.4172/jaa.10000612.

STUDY OF GENETIC STABILITY AND CONFIRMATION OF IDENTITY OF VNUKOVO-32 STRAIN, USED FOR PRODUCTION OF ANTIRABIC CULTURAL CONCENTRATED PURIFIED DRY VACCINE

¹Antonova L.P., ¹Kaa K.V., ²Samartseva T.G., ³Oksanich A.S.,
¹Mosolova S.V., ¹Ignatyev G.M.

¹Federal State Budgetary Scientific Institution «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and- Biological Products of Russian Academy of Sciences», Moscow, Russian Federation

²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, Russian Federation

³CJSC BTK “Bioservice”, Borovsk, Russian Federation

As with other RNA viruses, the rabies virus genome is characterized by high evolutionary variability. In the present study, the nucleotide sequences of the G gene fragment isolated from the production strain Vnukovo 32, the finished series of the rabies vaccine manufactured in 2012 and 2018, the CVS fixed rabies strain, used to evaluate specific activity, were examined for genetic stability. The possibility of using restriction analysis to confirm the identity of the Vnukovo-32 strain at all stages of production, including the finished vaccine form, was shown.

Keywords: Rabies, G gene, genetic stability, Vnukovo-32.

Поступила 04.09.2019

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ АСТРОЦИТОВ ИЗ ГИППОКАМПАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И ИХ НАНОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

¹Асташонок А.Н., ²Квачева З.Б., ²Филатова ЕА, ³Гузов С.А.,
¹Полещук Н.Н.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук», Минск, Республика Беларусь

³Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» Минск, Республика Беларусь

Резюме. Получена первичная культура высокодифференцированных астроцитов, изолированная из эксплантов гиппокампа взрослого человека, умершего от прогрессирующего демиелинизирующего заболевания ЦНС (энцефалит Шильдера). Описана цитоархитектоника клеток и проведена дифференциация иммуноцитохимическим методом пула астроцитарных клеток, экспрессирующих глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ). Количество астроцитов в среднем составило $45,4 \pm 12,2\%$. Наноскопический анализ позволил дифференцировать несколько морфотипов астроцитов и установить различия в топографии, параметрах микрорельефа (Ra, Rq, Rzk, Rz), а также оценить адгезивную потенцию. Охарактеризована их структурная гетерогенность. Полученная модель, на наш взгляд, может быть актуальной для изучения физиологических, нейрогуморальных и метаболических функций, а также патогенетических основ развития астропатий.

Ключевые слова: высокодифференцированные астроциты, атомно-силовая микроскопия, микрорельеф поверхности, идентификация.

Введение. Эмбриональные и региональные (т.е. выделенные из ткани взрослого организма) культуры ЦНС используются в молекулярной биологии на протяжении более 10 лет [1]. Несмотря на то, что эти культуры можно получать из любых анатомически значимых отделов мозга, однако именно клетки гиппокампа являются наиболее востребованными [2]. Характерной особенностью этих культур, отличающей их от первичных культур нейронов и других клеточных линий, является сохранение характерной для данного отдела мозга цитоархитектоники клеток и внутренних межнейронных связей [2]. Кроме того, показано, что активно-пролиферирующие стволовые клетки гиппокампа при патологических процессах в ЦНС могут участвовать в репаративной регенерации, замещая другие погибшие клеточные элементы [3]. Описаны геномные механизмы управления пролиферацией и дифференцировкой этих типов клеток. Это позволяет в условиях *in vitro* исследовать клеточные и молекулярные основы пластичности, делает их удобной моделью для скрининга биологически активных соединений, а также позволяет изучать механизмы патологических состояний ЦНС при нейродегенеративных заболеваниях (кортико-базальной дегенерации, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и др.) [3, 4]. Все эти факты открывают новые направления в исследовании функционирования и развития мозга как при нормальных (физиологических) состояниях, так и при патологических процессах в ЦНС.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из широко востребованных инструментов в клеточной биологии, которая обеспечивает не только получение с молекулярным разрешением топографических изображений поверхности различных типов клеток, но позволяет оценивать количественную оценку локальных упругих и адгезионных свойств клеток при изменениях структуры цитоскелета [5]. В настоящее время, глав-

ным образом с использованием эмбриональных тканей, описаны лишь немногочисленные работы в исследовании наноскопическим методом строения и функционирования клеток гиппокампа [6]. В отношении клеток взрослого организма такие исследования не проводились, что указывает о перспективности данного метода в фундаментальных и практических исследованиях.

Цель работы – используя наноскопический анализ оценить архитектуру, топографию и микрорельеф поверхности культивируемых астроцитов, полученных из аутопсийного материала гиппокампа человека.

Материалы и методы. *Получение первичных культур астроглиальных клеток ЦНС.* Использовали образцы медиальной части височной доли полушарий (область гиппокампа) головного мозга, полученные при патологоанатомическом вскрытии пациентки (29 лет), умершей от прогрессирующего демиелинизирующего заболевания ЦНС (диффузный периаксиальный энцефалит Шильдера, по МКБ-10 – рубрика G37). Выбор областей мозга для получения первичных культур клеток определялся наличием в этих структурах скрытого резерва стволовых и прогениторных клеток, являющихся источником «нейрогенных ниш», дающих начало новому поколению нейрональных клеток и макроглии (астроцитов, олигодендроцитов и т.д.).

Образцы кусочков ткани мозга доставлялись в лабораторию в асептических условиях в среде DMEM и антибиотиком гентамицином (40 мкг/мл). Условия хранения биоматериала – не более 3-4-х часов при +4°C. На первоначальном этапе ткань двукратно промывали фосфатно-солевым буфером DBSS (Sigma), далее измельчали в стерильной чашке Петри скрещенными скальпелями до получения фрагментов размером не превышавшим 1мм³. Затем с помощью 10 мл пипетки с широким носиком кусочки переносили в центрифужную пробирку (15 мл). Промывали дважды DBSS, супернатант удаляли, а фрагменты ткани (10-15 кусочков) переносили в культуральный флакон (Falcon) площадью 25 см². Вносили 2-3 мл ростовой среды DMEM, содержащую в избытке фетальную бычью сыворотку (20-30%) и антибиотик гентамицин (40 мкг/мл). Далее помещали в термостат на 24 ч. При прикреплении кусочков (спустя 8-10 дней) объем среды увеличивали до 5 мл на 25 см², а затем меняли среду каждые 3-4 дня до формирования первичных очагов роста. После достижения роста экспланты удаляли, а клетки рассеивали в новые культуральные флаконы. Количество клеток при пересеве подсчитывали в камере Горяева общепринятым способом. Наблюдение за ростом и развитием культур проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличениях x100-400.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). В работе использовали тейпинговые микронзонды NSC15/A1 BS («MikroMasch», РФ) из кремния с резонансной частотой 290-325 кГц и константами жесткости – 20-40 Н/м. Культуру диплоидных клеток, полученную из эксплантов, фиксировали в течение 20 мин в 96% этаноле. Топографические изображения астроглиоцитов получали на микроскопе Nanoscope IIIa MultiMode (Bruker, США), оборудованном J-сканером. При АСМ-анализе оценивали латеральные размеры клеток (высота, ширина, длина), форму, параметры микрорельефа поверхности (Ra, Rq, Rsk, Rz).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводили в программе Statistica 7.0 с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представляли, как среднее±стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение. *Наблюдение за миграцией клеток от эксплантов и формированием первичных очагов роста.* Светооптический анализ. При световой микроскопии на 14-16 сут. вокруг эксплантов отмечали образование первичных очагов роста, состоящих из агрегатов сцепленных друг с другом клеток (20-30) без набора селективных фенотипических признаков. Постепенно (22-24 сут.) отмечалось отпочкование новых мелких колоний из выросших крупных клеточных агрегатов, имеющих фенотипические различия.

Часть клонов в культуре прикреплялись к субстрату с помощью распластанных клеток с биполярными отростками (рисунок 1Б). Другая часть клонов была представлена округлыми, треугольными, ромбовидными или слегка вытянутой формы клетками с униполярными отростками (рисунок 1А, В). Последние, располагались единично или отдельными небольшими группами и находились на различных стадиях цитокенеза.

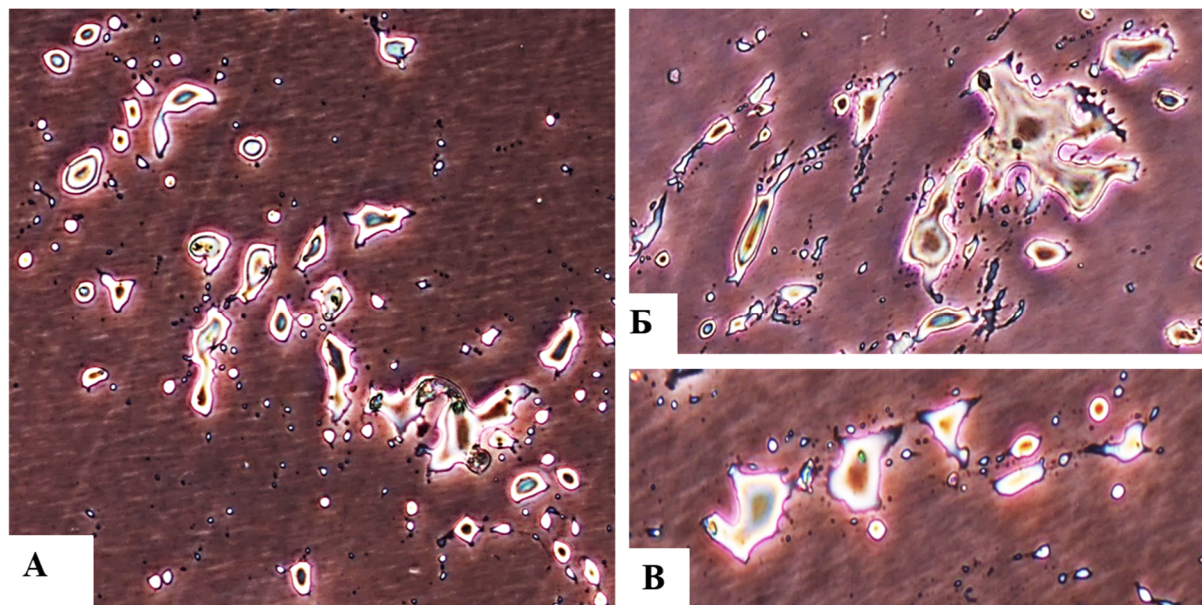


Рисунок 1. – Пул гетероморфных клеток с признаками спонтанной дифференцировки (24 сут. роста *in vitro*, клетки гиппокампа человека). Фазово-контрастная микроскопия (ув. x200)

При проведении иммуноцитохимического исследования для выявления фенотипических признаков астроцитов определяли экспрессию ГФКБ. Установлено, что в анализируемой культуре не наблюдалось превалирование астроцитарного монотипа. Количественное соотношение астроцитов в среднем составляло $45 \pm 12\%$. Дальнейшему более углубленному наноскопическому анализу подвергались клетки, сочетающие в себе признаки исключительно астроцитов.

Наноскопический анализ клеток астроцитарного фенотипа. На следующем этапе анализировали топографию и микрорельеф поверхности астроцитов. По результатам АСМ-анализа выделены различные морфотипы астроцитов.

На рисунке 2А, Г, Ж показаны изображения астроцитов гиппокампа, которые использовались для получения информации о высоте объектов. Максимальная высота клеток составила 2,2-2,4 мкм. Мелко масштабные структуры можно хорошо разглядеть на данных изображениях, которые разделяли сом (тело клетки) на отдельные области. В some различался центральный бугристый участок, соответствующий расположению клеточного ядра. На рисунке 2Б-Д эта область заметно выступает при анализе микропрофилей сечения образца, что указывает об ее высокой специализации и структурированности.

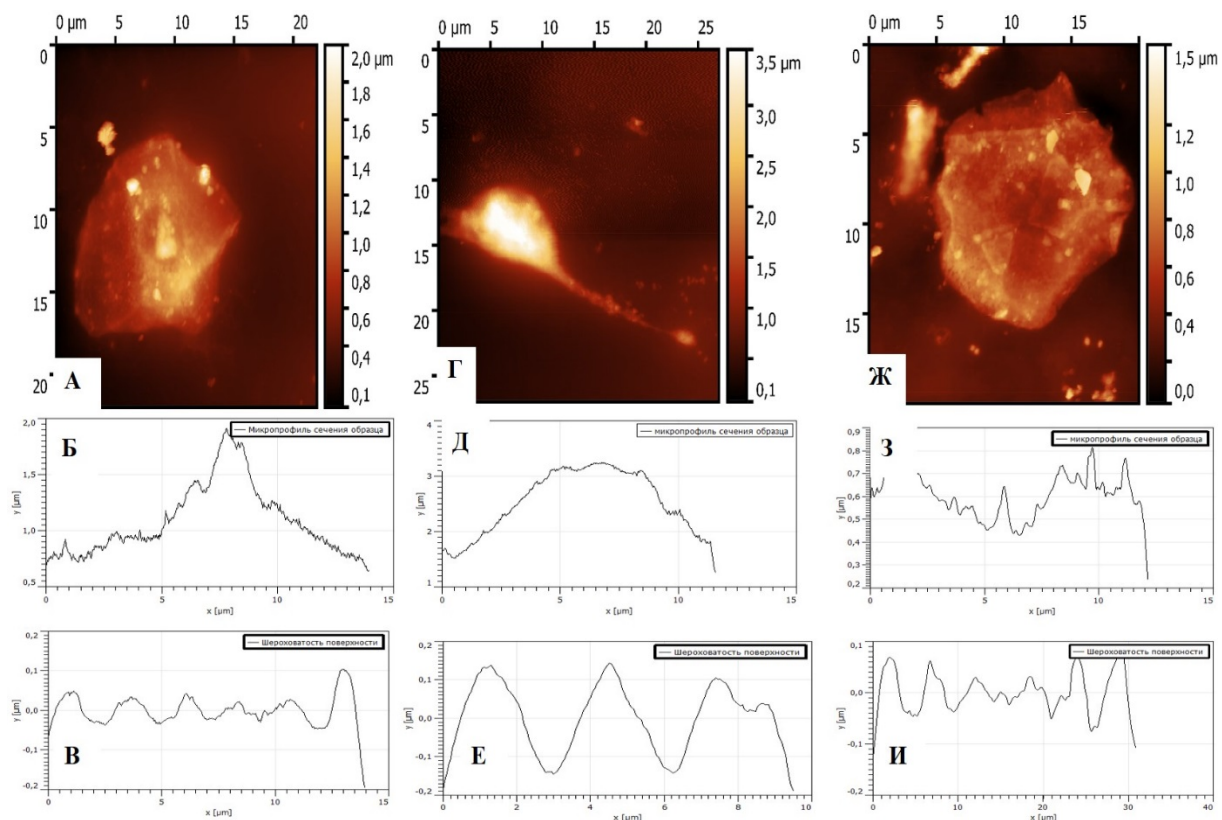


Рисунок 2. – Топография и особенности микрорельефа поверхности клеток астроцитарного фенотипа по результатам атомно-силовой микроскопии

Структурные элементы цитоскелета окружающие ядро также имели сложную организацию. Вдоль центральной области цитоскелета и ближе к периферии (рисунок 2А, Ж) были хорошо заметны крупные осевые фибриллы шириной 300-500 нм, хорошо пронизывающие клетку. Окружающий клетку внеклеточный матрикс был представлен высокоадгезированными частицами округлой формы диаметром 80-100 нм и высотой 20 нм. Более крупные частицы имели размер около 150 нм и, вероятно, соответствовали участкам агрегации мембранных белков цитоплазматической мембраны астроцитов.

При анализе микрорельефа (шероховатости) поверхности астроцитов выявлялись участки с резкими перепадами между пиками и впадинами. По параметрам микрорельефа (R_a , R_q , R_{sk} , R_z) различались астроциты, имеющие, как правило, пилообразный микропрофиль, что характерно для активно-пролиферирующих астроцитов [7]. Средние значения параметров (R_a , R_q , R_{sk}) составили: $R_a - 0,076 \pm 0,009$ мкм, $R_q - 0,094 \pm 0,007$ мкм, $R_{sk} - 0,4$, $R_z - 0,327 \pm 0,12$ мкм), что свидетельствует о пластичности анализируемых клеток, отсутствие выраженной ассиметрии поверхности и более равномерном распределении поверхностных белковых кластеров.

Согласно данным других авторов, ряд клеток ЦНС, включая астроциты, выделенные из различных областей мозга, морфологически могут быть идентичны между собой, однако функционально различаются [8]. Это позволяет их дифференцировать с помощью АСМ-анализа. Так, например, клетки микроглии имеют среднюю высоту 10-300 нм и относительно плоские, что указывает о различиях в соотношении ядерно-цитоплазматического индекса этих клеток. Более крупные клетки, такие как нейроны, имеют высоту не менее 700-1000 нм и трехмерных эффект их структуры значительно выражен из-за наличия в структуре специфических аксодендритических моно- или биполярных отростков [9].

Таким образом, полученные нами результаты позволяют дифференцировать и отличать описанные морфотипы астроцитов от других клеток ЦНС (микроглии, нейронов) даже при выделении культуры клеток из ткани мозга. Особый интерес представляло также изучение адгезивных свойств, выделенных астроцитов. Хорошо известно, что белки семейства интегринов обеспечивают прикрепление или закоревание астроцитов к поверхностному или внеклеточному субстрату [10]. Актиновые филаменты, наблюдаемые нами внутри цитоскелета астроцитов, образуют более прочный остов, который поддерживает механическую прочность и усиливает фокусные контакты [10]. Белковые молекулы, выявленные по результатам АСМ-анализа на поверхности астроцитов, вероятно, выполняют амортизирующую функцию, создавая большие силы сцепления. Это указывает о высокой величине адгезии анализируемых клеток к субстрату и их выраженной специализации. Известно, что адгезивные свойства также могут быть усилены при добавлении в питательную среду определенных компонентов, например, эмбриональной телячьей сыворотки, ретиноевой кислоты [11].

Заключение. Таким образом, охарактеризована топография и определены количественные значения параметров микрорельефа поверхности высокодифференцированных астроцитов, выделенных из гиппокампальной области мозга. Полученные результаты позволили по параметрам топографии поверхности, количественным значениям микрорельефа (R_a , R_q , R_{sk} , R_z), высоте клеток (h) выделить различные субпопуляции астроцитов. Показана возможность также различать по цитоархитектонике, топографии и микрорельефу поверхности астроциты от других субтипов клеток макроглии, нейронов и микроглии. Разработанная модель перспективна для изучения физиологических, нейрогормональных и метаболических функций различных субтипов астроцитов и актуальна для проведения различных фундаментальных нейробиологических исследований.

Литература

1. Gordon, J. General overview of neuronal cell culture / J. Gordon, S. Amini, M. White // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 078. – P. 1–8.
2. Opitz-Araya, X. Organotypic hippocampal slice cultures / X. Opitz-Araya, A. Barria // *J. Vis. Exp.* – 2011. – Vol. 48. – P. 1–3.
3. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies / N. Daviaud [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2013. – Vol. 248. – P. 429–440.
4. Studying neurodegenerative diseases in culture models / J. Schlachetzki [et al.] // *Rev. Bras. Psiquiatr.* – 2013. – Vol. 35. – P. 92–100.
5. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology / Y. Dufrene [et al.] // *Nature Nanotechnol.* – 2017. – Vol. 12. – P. 295–307.
6. Three-dimensional structural changes in living hippocampal neurons imaged using magnetic AC mode atomic force microscopy / Y. Sun [et al.] // *J. Electron Microscopy.* – 2006. – Vol. 55. – P. 165–172.
7. Atomic force microscopy study of the arrangement and mechanical properties of astrocytic cytoskeleton in growth medium / Yu. Efremov [et al.] // *Acta Naturae.* – 2011. – Vol. 3. – P. 93–99.
8. Влияние гипоксии на морфофункциональные параметры астроцитов в монослойной культуре / З.Б. Квачева [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1996. – Т. 122, № 11. – С. 581–584.
9. Atomic force microscopy as an advanced tool in neuroscience / M. Jembrek [et al.] // *Transl. Neurosci.* – 2015. – Vol. 6. – P. 117–130.
10. Focal adhesion molecules regulate astrocyte morphology and glutamate transporters to suppress seizure-like behavior / S. Choa [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2018. – Vol. 115, No. 44. – P. 11316–11321. doi: 10.1073/pnas.1800830115.
11. Retinoic acid-induced differentiation into astrocytes and glutamatergic neurons is associated with expression of functional and activable phospholipase D / M. Rujano [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 2. – P. 387–392.

OBTAINING OF HIGHLY DIFFERENTIATED ASTROCYTES FROM THE HUMAN BRAIN HIPPOCAMPAL REGION AND THEIR NANOSCOPIC ANALYSIS

¹Astashonok A.N., ²Kvacheva Z.B., ²Filatova EA, ³Guzov S.A., ¹Poleshchuk N.N.

¹Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Biophysics & Cell Engineering of National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

A primary culture of highly differentiated astrocytes was obtained, which was isolated from hippocampal explants of an adult human brain who had died from a progressive demyelinating disease of the central nervous system (Schilder's encephalitis). Cell cytoarchitectonics were described and differentiation by the immunocytochemical method of a pool of astrocytic cells expressing glial fibrillar acid protein (GFAP) were carried out. The number of astrocytes were averaged $45.4 \pm 12.2\%$. Nanoscopic analysis was made it possible to different several morphotypes of astrocytes and establish differences in topography, surface roughness parameters (Ra, Rq, Rz), as well as evaluate the adhesive potency. Their structural heterogeneity was characterized. The resulting model, in our opinion, may be relevant for the study of physiological, neurohumoral and metabolic functions, as well as the pathogenetic basis for the development of astropathy.

Keywords: highly differentiated cultures of astrocytes, atomic force microscopy, surface roughness, identification.

Поступила 09.09.2019

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ Fe₃O₄ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ

¹Поддубнов С.В., ²Орёл Н.М., ¹Счеслёнок Е.П., ¹Семижон П.А.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Резюме. С использованием спектрофотометрических методов проведено исследование влияния наночастиц Fe₃O₄ на спектральные характеристики эритроцитов крови. Показано, что при внесении водного раствора наночастиц Fe₃O₄ в различных концентрациях во фракцию разведенных эритроцитов не наблюдается значительного изменения спектральных показателей. Также показано, что наночастицы Fe₃O₄ в различных концентрациях практически не оказывают влияния на степень гемолиза эритроцитов.

Ключевые слова: наночастицы, оксид железа, спектральные характеристики эритроцитов, гемолиз эритроцитов, спектрофотометрические методы исследования.

Введение. В последние десятилетия в научной лексике всё чаще стали использоваться термины с префиксом «нано». Так наноотехнологии набирают серьёзные обороты в различных сферах биологии и медицины. Например, весьма эффективным стал метод таргетной терапии опухолей с использованием наночастиц металлов, которые в свою очередь функционализированы различными лигандами. Наночастицы тяжёлых металлов активно используются в качестве контейнеров для доставки лекарственных соединений к тканям-мишеням при проведении

фотодинамической и радиотерапии. Помимо этого наночастицы обладают способностью вызывать развитие оксидативного стресса, что может приводить к гибели клеток, в частности опухолевых [1].

Однако наночастицы оказывают и негативное действие на различные процессы, происходящие в организме человека. Доказано, что данные структуры имеют большой процент оседания в организме человека, а также легко проникают во все системы органов. После попадания через дыхательную систему, кожный эпителий или ЖКТ внутрь, наночастицы металлов зачастую оказывают нейротоксическое, гепатотоксическое, кардиотоксическое и иммунотоксическое действие [2, 3]. Также имеются сведения о канцерогенном и мутагенном влиянии таких структур на организм человека.

Существует ряд научных трудов о влиянии наночастиц тяжёлых металлов на антиоксидантный статус эритроцитов в норме и при различных патологиях [1, 2].

Цель исследования: изучение влияния наночастиц Fe_3O_4 на спектральные характеристики эритроцитов.

Материалы и методы. Биохимическая часть работы была выполнена на беспородных белых крысах самцах, массой 180-200 г, находившихся на стандартном рационе вивария. Исследования проведены на эритроцитах крови крыс *in vitro*. Работа с животными проводилась согласно всем правилам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов в научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

Для выделения эритроцитов кровь собирали в пробирку с антикоагулянтом (3,8% раствор цитрата Na в соотношении кровь : цитрат Na – 9 : 1). Для точности дальнейших определений эритроциты выделяли из 1 мл крови путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Плазму аккуратно отбирали пипеткой и удаляли. Эритроциты три раза промывали охлаждённым раствором, содержащим 0,145 моль/л NaCl в 0,02 моль/л трис-HCl буфере (pH 7,6 при температуре 20°C), каждый раз осаждая клетки в том же режиме (при 3000 об/мин в течение 10 мин).

Для приготовления необходимого раствора наночастиц Fe_3O_4 использовали сухой порошок марки Nanostructured & Amorphous Materials inc. (США), который растворяли в деионизированной воде, 0,02 % раствор наночастиц подвергали ультразвуковой обработке непосредственно перед каждым опытом. Данная процедура проводилась с помощью ультразвукового гомогенизатора BANDELIN «SONOPLUS 3100». Спектральные характеристики эритроцитов определяли на спектрофотометре «Cary 50». Сухой порошок наночастиц Fe_3O_4 был любезно предоставлен Научно-исследовательской лабораторией биохимии обмена веществ кафедры биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Для определения спектральных характеристик эритроциты, выделенные из 1 мл крови, разводили 0,9% NaCl в соотношении 1 : 500.

В пробирки «эппендорф» №№ 1, 2, 3 вносили по 0,4 мл 0,02% раствора наночастиц Fe_3O_4 , обработанного ультразвуком, и осаждали при 10 000 g в течении 30 мин. Осаждение наночастиц проводили на центрифуге «Biofugерico». После центрифугирования супернатант аккуратно отбирали и удаляли. Затем для спектрофотометрии готовили образцы, содержащие наночастицы и эритроциты, как указано в таблице 1.

Таблица 1. – Приготовление образцов для спектрофотометрии

№ пробирки	0,9 % раствор NaCl (мл)	Эритроциты, разведенные 1:500 (мл)	Конечная концентрация наночастиц Fe ₃ O ₄ в 1 мл образца (мг)
Пробирки с осадком наночастиц Fe ₃ O ₄			
1	-	8	0,1
2	-	4	0,4
3	-	1	0,8
Пробирка без осадка наночастиц Fe ₃ O ₄			
4 (Контроль)	-	1	-
5 (Холостая проба)	1	-	-

Образцы тщательно перемешивали пипетированием с последующим встряхиванием. Спектры поглощения образцов определяли через 10, 20, 30, 40 и 60 мин против 0,9% раствора NaCl (холостая проба) на спектрофотометре в 5 повторях.

Процент гемолиза эритроцитов рассчитывали по следующей формуле:

$$C = \frac{A1}{A1+A2} * 100, \text{ где:}$$

A1 – поглощение наночастиц через 10 мин после внесения в образец;

A2 – поглощение наночастиц через 60 мин после внесения в образец [4].

Результаты и их обсуждение. Для проведения спектрометрического анализа к суспензии эритроцитов в различных концентрациях добавляли наночастицы Fe₃O₄ с последующим определением спектральных характеристик. Контролем служили спектральные характеристики эритроцитов, которые разводили 0,9% раствором NaCl в соотношении 1 : 500. Показания, полученные при измерении контрольных проб, представлены на рисунке 1.

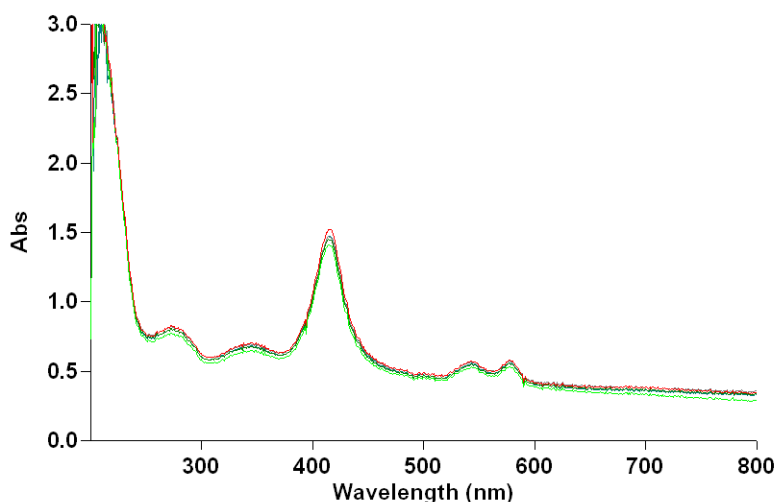


Рисунок 1. – Контрольные показания спектрофотометра

При замере на спектрофотометре через 10 мин после добавления 0,1 мг наночастиц Fe₃O₄ в эритроцитарную фракцию, наблюдается незначительное повышение значения оптической плотности относительно контроля на 11,4%, а при следующих измерениях показатели остаются на прежнем уровне. Оптическая плотность при длине волны 545 нм и при 590 нм через 10 мин после внесения наночастиц, имеет тенденцию к понижению

на 25%, через 20 мин на 30% и спустя 30 мин значение остаётся на том же уровне. Через 40 мин значение оптической плотности снижется на 38%, а через 60 мин остаётся на том же уровне относительно контроля (рисунок 2).

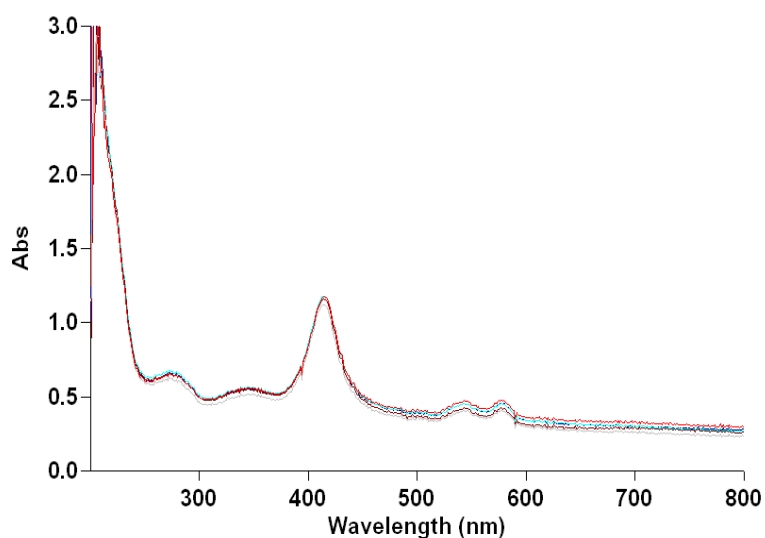


Рисунок 2. – Изменение спектральных характеристик эритроцитов крови при внесении 0,1 мг наночастиц Fe_3O_4

При измерении оптической плотности через 10 мин после внесения 0,4 мг наночастиц Fe_3O_4 наблюдается тенденция к её уменьшению относительно контроля на 13,1% и в следующих 4 измерениях значения не изменяются. Оптическая плотность при длине волны 545 нм и при 590 нм, измеренная через 10 мин после внесения наночастиц, незначительно снижается на 20%, через 20 и 30 мин остаётся на этом же уровне, через 40 мин снижется на 25% относительно контроля и спустя 60 мин сохраняется на этом же уровне (рисунок 3).

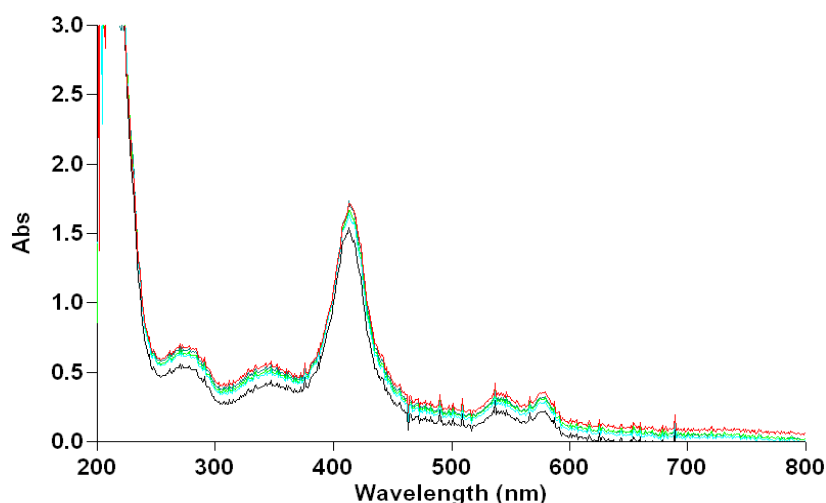


Рисунок 3. – Изменение спектральных характеристик эритроцитов крови при внесении 0,4 мг наночастиц Fe_3O_4

Внесение 0,8 мг наночастиц Fe_3O_4 при замере на спектрофотометре через 10, 20, 30 и 40 мин практически не приводит к изменению показателей оптической плотности.

Только спустя 60 мин наблюдается тенденция к снижению значений на 11% относительно контроля. Оптическая плотность при длине волны 545 нм и при 590 нм при замере через 10 мин имеет тенденцию к понижению на 10%, а в последующих измерениях остаётся на том же уровне. Описанные выше результаты отображены на рисунке 4.

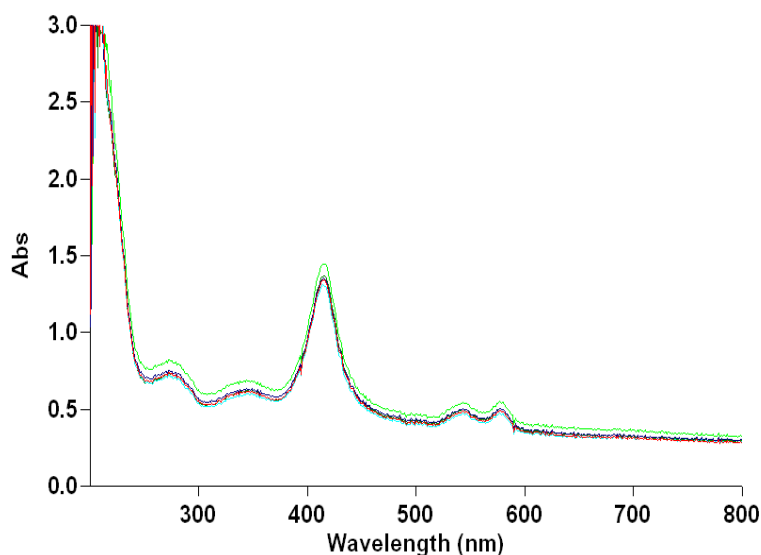


Рисунок 4. – Изменение спектральных характеристик эритроцитов крови при внесении 0,8 мг наночастиц Fe₃O₄

При использовании наночастиц Fe₃O₄ в различных концентрациях не наблюдается значительного изменения оптической плотности. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что наночастицы Fe₃O₄, в различных концентрациях не оказывают значительного влияния на спектральные характеристики эритроцитов. Это говорит о том, что при воздействии данных наночастиц не изменяется целостность и молекулярная структура плазматической мембраны эритроцитов.

Дополнительно был проведён эксперимент по исследованию влияния наночастиц Fe₃O₄ в различных концентрациях на степень гемолиза эритроцитов крови испытуемых животных. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Степень гемолиза эритроцитов после внесения наночастиц Fe₃O₄ в различных концентрациях

<i>Серии опытов</i>	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	<i>Процент к контролю</i>
Интактные эритроциты (контроль)	52,4	100,0
Внесение 0,1 мг наночастиц Fe ₃ O ₄	52,8	100,7
Внесение 0,4 мг наночастиц Fe ₃ O ₄	50,9	97,1
Внесение 0,8 мг наночастиц Fe ₃ O ₄	52,8	100,7

В результате было показано, что вне зависимости от концентрации наночастиц Fe₃O₄, степень гемолиза по отношению к контрольным показаниям практически не изменяется. Из этого следует, что наночастицы Fe₃O₄ не обладают разрушительным действием на эритроцитарные мембраны.

Заключение. Исходя из результатов, полученных при исследовании воздействия различных концентраций раствора наночастиц Fe₃O₄, установлено, что заметного влияния на спектральные характеристики эритроцитов они не оказывают. Наблюдаются лишь незначительные отклонения от значений контрольных результатов. Вероятнее всего полученные результаты связаны с тем, что в молекулах гемоглобина, локализованных в эритроцитах, присутствуют ионы железа. Следовательно, значительных изменений спектральных характеристик при воздействии наночастиц Fe₃O₄ на эритроциты не наблюдается.

Также, исходя из результатов, полученных в ходе расчёта степени гемолиза эритроцитов, наночастицы Fe₃O₄ в различных концентрациях не обладают разрушительным воздействием на эритроцитарные мембраны.

Литература

1. Влияние наночастиц железа на состояние вободнорадикальных процессов в крови крыс с фибросаркомой при различном противоопухолевом эффекте / И.А. Горюшинская [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 7-1. – С. 9-13.
2. Черницкий, Е.А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е.А. Черницкий, А.В. Воробей. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
3. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles / C.P. Reis [et al.] // Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. – 2006. – Vol. 2. – P. 8-21.
4. Moriarty, P. Nanostructured materials / P. Moriarty // Rep. Prog. Phys. – 2001. – Vol. 64. – P. 297-381. doi: 10.1088/0034-4885/64/3/201

RESEARCH THE INFLUENCE OF Fe₃O₄ NANOPARTICLES ON THE SPECTRAL CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES

¹Poddubnov S.V. ²Oryol N.M., ¹Scheslenok E.P.¹ ¹Semizhon P.A.¹

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

²*Biological Faculty of BSU, Department of Biochemistry, Minsk, Republic of Belarus*

Using spectrophotometric methods, we studied the effect of Fe₃O₄ nanoparticles on the spectral characteristics of red blood cells. It was shown that when an aqueous solution of Fe₃O₄ nanoparticles in various concentrations was introduced into the fraction of exploratory erythrocytes, no significant changes in spectral indices were observed. It was also shown that Fe₃O₄ nanoparticles in various concentrations have practically no effect on the degree of hemolysis of red blood cells.

Keywords: Nanoparticles, iron oxide, spectral characteristics of red blood cells, erythrocyte hemolysis, spectrophotometric research methods.

Поступила 17.09.2019

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ

¹Рябцева Т.В., ²Макаревич Д.А., ¹Кирковский В.В., ²Голубович В.П.

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Резюме. В статье описана методика определения цитокинпродуцирующей активности нейтрофилов. Постановка методики делится на два этапа: 1-й этап – активация нейтрофилов в цельной периферической крови, 2-й этап – определение концентрации цитокинов в супернатанте. Для активации использовали гликопротеин клеточной стенки пекарских дрожжей. В статье представлены также результаты по апробации данного метода для оценки функциональной активности нейтрофилов крови практически здоровых доноров и пациентов с хроническими гнойно-воспалительными заболеваниями кожи.

Ключевые слова: нейтрофил, цитокины, гликопротеин.

Введение. Нейтрофилы наиболее многочисленные представители белых клеток периферической крови. Нейтрофилы в ответ на стимуляцию продуцируют про- и противовоспалительные цитокины (включая ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-1 γ , ИЛ-6), хемокины (ИЛ-8 и др.), колониестимулирующие и ростовые факторы. Таким образом, нейтрофилы функционально вовлечены в течение различных физиологических и патологических процессов, таких как гемопоэз, ангиогенез, аутоиммунные и воспалительные заболевания [1]. Для изучения цитокинпродуцирующей функции нейтрофилов существует множество современных методов: иммуноферментный анализ (определение концентрации цитокинов в биологических средах), иммуноблоттинг, иммунофлуоресценция (изучение рецепторов цитокинов на поверхности клеток), проточная цитофлуореметрия (изучение внутриклеточных цитокинов), конфокальная микроскопия, полимеразная цепная реакция (изучение мРНК цитокинов)[2]. Однако, несмотря на многочисленность и высокотехнологичность существующих методов, изучение цитокинпродуцирующей активности нейтрофилов остается весьма трудоемким и дорогостоящим процессом. Таким образом, разработка новых методов изучения цитокинпродуцирующей активности нейтрофилов является актуальной и необходимой для клинической иммунологии задачей.

Цель работы – разработка методики определения цитокинпродуцирующей активности нейтрофилов в периферической крови человека. Основными задачами для достижения цели являлись:

Изучение физико-химических свойств полученного олиганда.

Определение оптимального соотношения «кровь : активатор» для проведения методики.

Определение оптимальной продолжительности инкубации для оценки концентрации синтезированных провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α).

Изучение возможности применения данной методики для сравнительной оценки функционального статуса нейтрофилов здоровых доноров и пациентов с хроническими гнойно-воспалительными заболеваниями кожи.

Для разработки методики был выбран вариант проведения активации нейтрофилов в цельной крови человека с целью минимизации повреждения нейтрофилов, которое происходит при их выделении на градиенте плотности фиколл-верографина. В ка-

честве активирующего лиганда был выбран гликопротеин клеточной стенки пекарских дрожжей, который, как известно, обладает митогенной активностью по отношению к нейтрофилам и моноцитам, опосредованной толл-лайк рецепторами 2 и 6. Простота и дешевизна получения данного лиганда делает его широкодоступным для применения в практике.

Материалы и методы. Лиганд получали методом, описанным в патенте № 21957 от 30.06.2018 из пекарских дрожжей. В работе использовали кровь практически здоровых доноров (n=20). Исходная концентрация цитокинов в плазме крови доноров: ИЛ-6 – 0,00 (0,11;0,67) пг/мл, ИЛ-8 – 2,25 (0,21;3,27) пг/мл, ФНО- α – 0,00 (1,10;3,70) пг/мл. Раствор NaCl (0,9%). Иммуноферментные наборы для определения ИЛ-6, ИЛ-8, и ФНО- α (Вектор-Бест, Россия). В работе использовали спектрофотометр Multiskan (Финляндия) и центрифугу лабораторную Ferox MC-24.

Для обработки результатов использовали методы непараметрической статистики, персональный компьютер, пакет программ Statistica 10.0. Результаты представлены в виде Медиана (25 перцентиль; 75 перцентиль).

Общая схема постановки методики. В пробирку с цельной гепаринизированной кровью человека добавляли раствор активатора (10 мг/мл). Перемешивали мягким пипетированием. Инкубировали при 37°C. Инкубацию проводили в течение 90 мин, за исключением эксперимента по изучению динамики синтеза цитокинов нейтрофилов. Затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Супернатант отбирали для определения концентрации цитокинов. Для каждой пробы ставили контроль, где вместо лиганда активатора добавляли физиологический раствор (NaCl (0,9%)).

Таблица 1. – Схема эксперимента по изучению соотношения «кровь : активатор»

<i>Соотношение «кровь : активатор»</i>	<i>Кровь, мл</i>	<i>Гликопротеин, мл</i>	<i>Физ. р-р, мл</i>
1 : 1	2	2	0
2 : 1	2	1	1
4 : 1	2	0,5	1,5
6 : 1	2	0,25	1,75

Таблица 2. – Схема эксперимента по изучению влияния количества нейтрофилов (крови) на концентрацию цитокинов

<i>Соотношение «кровь : активатор»</i>	<i>Кровь, мл</i>	<i>Гликопротеин, мл</i>	<i>Физ. р-р, мл</i>
1:1	2	2	0
1:2	1	2	1
1:4	0,5	2	1,5
1:6	0,25	2	1,75

Результаты. Статистический анализ результатов экспериментов по изучению влияния концентрации гликопротеинов на активность синтеза цитокинов лейкоцитами периферической крови показал статистически значимую разницу между группами (p=0,009, медианный тест, хи-квадрат=8,00). Корреляционная зависимость концентрации ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α в плазме крови в зависимости от концентрации активатора носит обратный характер. Для ИЛ-6 R=-0,63 (p=0,09). Для ИЛ-8 R=-0,48 (p=0,22). Для ФНО- α R=-0,93 (p=0,0009). Корреляционный анализ показал наличие прямой корреляционной зависимости между синтезом ИЛ-6 и ФНО- α (p=0,026, R=0,69), ИЛ8- и ФНО- α

($p=0,002$, $R=0,86$), а вот между ИЛ-6 и ИЛ-8 статистически значимой корреляции не обнаружено ($p=0,29$, $R=0,37$).

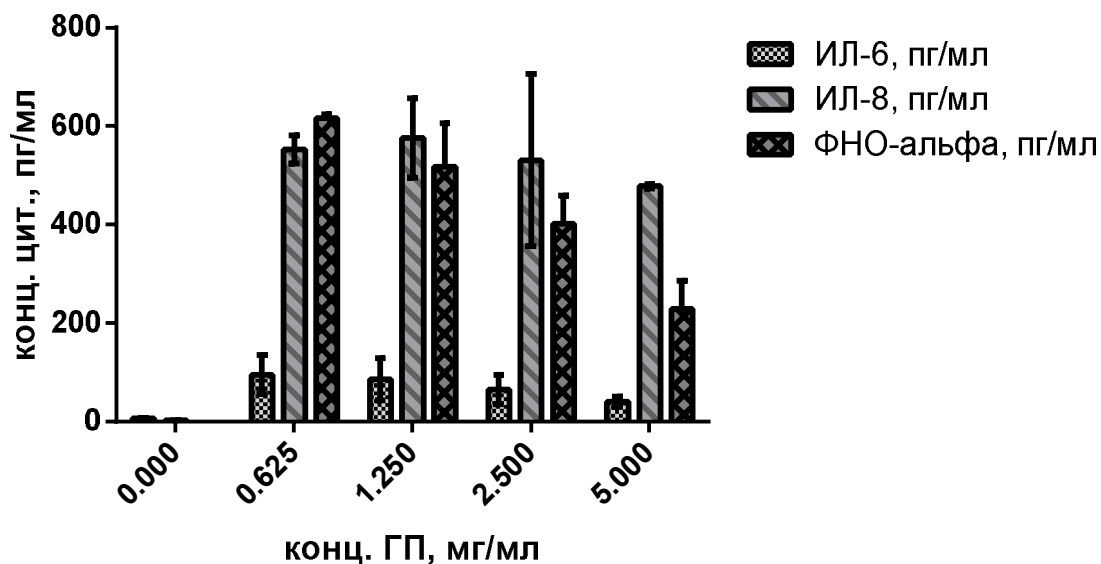


Рисунок 1. – Влияние концентрации гликопротеина клеточной стенки дрожжей на синтез провоспалительных цитокинов лейкоцитами периферической крови

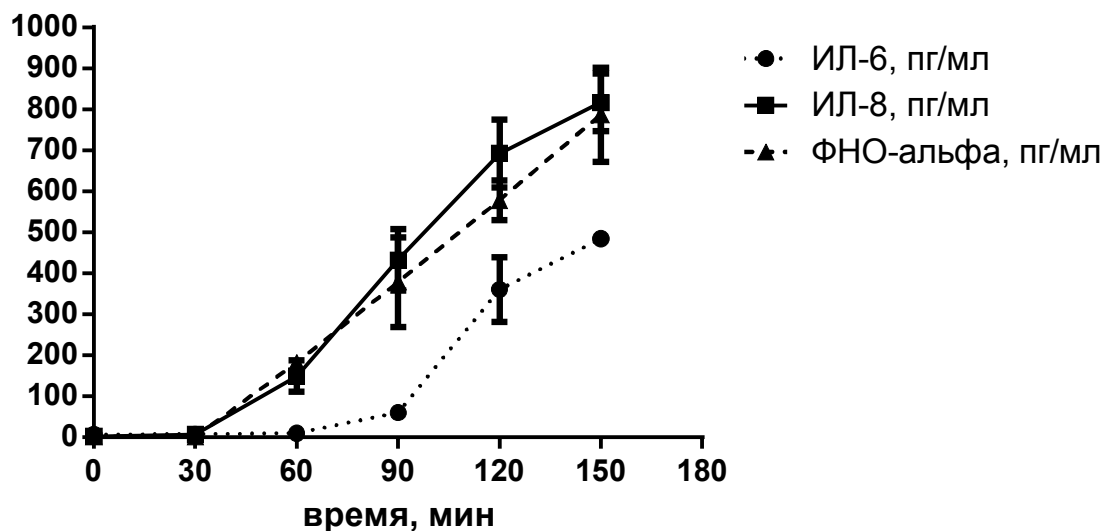


Рисунок 2. – Динамика синтеза провоспалительных цитокинов лейкоцитами периферической крови в ответ на активацию гликопротеином клеточной стенки дрожжей

Изучение динамики синтеза цитокинов лейкоцитами периферической крови в ответ на стимуляцию гликопротеином клеточной стенки дрожжей показало, что заметные

концентрации ИЛ-8 и ФНО- α определяются через 60 мин инкубации при 37°C. Для продукции ИЛ-6 требуется больше времени, увеличение концентрации данного цитокина можно наблюдать через 90 мин инкубации с активатором. В последующем концентрация цитокинов нарастает, причем увеличение концентрации между 60 и 120 минутами инкубации носит линейный характер зависимости ($p=0,0054$).

Выводы:

Для дальнейших экспериментов использовали оптимальное время инкубации – 90 минут. А соотношение кровь : гликопротеин равное 2 : 1, где конечная концентрация гликопротеина составила 1,250 мг/мл.

Для подсчета цитокинпродуцирующей активности нейтрофилов была предложена следующая формула:

$K = \Delta C / H$, где K - активность синтеза цитокинов, выраженная в пг на 1000000 (10⁶) нейтрофилов, ΔC – нарастание концентрации цитокина за время инкубации, H – абсолютное количество нейтрофилов в крови человека.

Литература

1. Cytokine production by human neutrophils: revisiting the “dark side of the moon”/ N. Tamassia [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. – 2018. – Vol. 48, suppl. 2. – e12952. doi: 10.1111/eci.12952

2. Biological roles of neutrophil-derived granule proteins and cytokines / M.A. Cassatella [et al.] // Trends Immunol. – 2019. – Vol. 40, No. 7. – P. 648-664. doi: 10.1016/j.it.2019.05.003

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR STUDYING NEUTROPHILS CYTOKINES-DERIVED ACTIVITY

¹Ryabzeva T.V., ²Makarevich D.A., ¹Kirkovskiy V.V., ²Golubovich V.P.

¹*Belarussian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

The article describes the methodology for determining the neutrophils cytokine-derived activity. The statement of the technique is divided into two stages: the 1st stage – the activation of neutrophils in whole peripheral blood, the 2nd stage – determination of the concentration of cytokines in the supernatant. For activation was used glycoprotein of the baker's yeast cell wall.

Keywords: neutrophil, cytokines, glycoprotein.

Поступила 18.09.2019

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 30-31 октября 2019 г.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

¹Адамович А. Ю., ¹Дыбов О. Г., ²Старостин А.М., ¹Игнатович Т.В.

¹Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

²Учреждение здравоохранения «Минская областная клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), включающие язвенный колит и болезнь Крона, являются хроническими и рецидивирующими воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта и не имеют эффективных протоколов лечения. Учитывая достижения в развитии клеточных технологий, представляется актуальным создание валидной экспериментальной модели ВЗК для проведения доклинических испытаний и оценки эффективности использования биомедицинских клеточных продуктов.

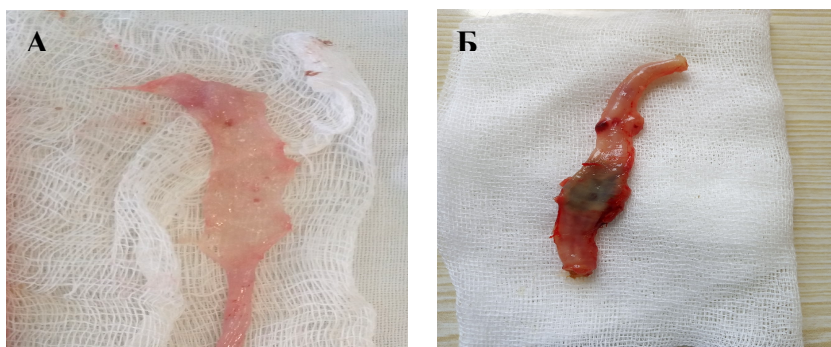
Химически индуцированные модели являются предпочтительными в экспериментальных исследованиях ВЗК. Самые распространённые из них: использование 100 мг/кг тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС), 100 мг/кг динитробензолсульфоновой кислоты (ДНБС), 3–10 % декстрана сульфата натрия (ДСН), 4–10% уксусной кислоты (УК) [1], которые развиваются в течение 6-8 дней. Однако, при пероральном использовании ДСН тяжело контролировать объем поглощенного раствора животными, введение УК сопровождается высокой летальностью, использование ТНБС экономически невыгодно из-за высокой стоимости вещества.

Исходя из этого, целью работы является создание валидной экономически-обоснованной экспериментальной модели ВЗК.

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовали белых лабораторных крыс линии Wistar (n=18) весом 300-320 г. Крысы голодали в течение 48 ч до начала эксперимента. За сутки до введения повреждающего вещества парентерально вводили 7,4% раствора «Фордрайв» из расчета 4 мл на 100 г массы лабораторного животного. Затем крысы были частично наркотизированы внутрибрюшинным введением тиопентала натрия и разделены на 2 группы: группа I (группа сравнения, n=9) – вводили ректально 250 мкл 50% этанола и выдерживали вертикально в течение 20 сек, группа II (опытная группа, n=9) – 30 мг (90 мг/кг) ДНБС в 250 мкл 50% этанола. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985). Валидность модели оценивалась клинически, морфологически и макроскопически. Статистическая обработка данных проводилась непараметрическим U-критерием и расчетом медианы (25-й ÷ 75-й процентиля).

Результаты исследования. В первые 48 ч у животных опытной группы II отмечались клинические проявления патологического процесса: диарея, кровь в кале, загрязнение кожи вокруг анального отверстия, снижение двигательной активности, потеря веса.

На 4 сутки после моделирования повреждения наблюдался левосторонний язвенный проктосигмоидит с поверхностными гнойными изъязвлениями до 1,5 см, покрытыми фибрином (рисунок).



А – толстая кишка крысы из группы сравнения (I),
 Б – толстая кишка с гиперемией и гнойным изъязвлением крысы из опытной группа (II)

Рисунок. – Макроскопические проявления токсического повреждения

Также, в опытной группе отмечались гиперемия слизистой оболочки и токсический мегаколон, о чем свидетельствует значительное увеличение отношения массы толстой кишки к ее длине ($0,0483[0,0447\div 0,0669]$) по сравнению с контрольной группой ($0,0367[0,03\div 0,04]$), $p=0,0135$.

Заключение. Учитывая клинические, морфологические и макроскопические показатели и статистически значимые различия отношения массы и длины толстой кишки, разработанный метод даёт возможность получить в течение 4 суток валидную ДНБС-индуцированную экспериментальную модель ВЗК у лабораторных крыс с использованием более низкой концентрации препарата и предварительного очищения раствором «Фордрайв» кишки.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, экспериментальная модель, динитробензойная кислота, фордрайв.

Литература

1. Экспериментальное моделирование болезни Крона и язвенного колита [Электронный ресурс] / М.В. Осиков [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 4. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25072>. – Дата доступа: 23.09.2019.

EXPERIMENTAL MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

¹Adamovich H. Y., ¹Dybau A.G., ²Starastsin A.M., ¹Ihnatovich T.V.

¹Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Republic of Belarus

²Minsk Regional Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

The method of experimental inflammatory bowel diseases with preliminary intestinal catharsis with «Fordrive» solution and rectal dinitrobenzolsulfonic acid introduction of 90 mg/kg allows to obtain a valid damage model with pronounced clinical and morphological symptoms within 4 days.

Keywords: inflammatory bowel diseases, experimental model, dinitrobenzolsulfonic acid, for-drive.

Поступили 25.09.2019

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *NEISSERIA GONORRHOEAE*, 2017-2018 гг.

¹Анискевич А.В., ¹Шиманская И.Г., ¹Голубовская Т.Н., ¹Станиславова И.Н.,
¹Суслов В.С., ²Унемо М.

¹Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

²Университетский госпиталь Эребру, Швеция

Цель исследования – оценить показатели антибиотикорезистентности штаммов *Neisseria gonorrhoea* в Республике Беларусь и определить тенденции в их изменении по сравнению с периодом 2009-2013 гг.

Материалы и методы. В работе были исследованы 36 штаммов *N. gonorrhoeae* (34 культуры, г. Могилев; 2 культуры, г. Витебск), выделенные в период 2017-2018 гг.

Определялась чувствительность *N. gonorrhoeae* к цефтриаксону, цефиксиму, азитромицину, ципрофлоксацину, спектиномицину, бензилпенициллину, тетрациклину и гентамицину с использованием E-теста (количественный метод определения минимальной ингибирующей концентрации антимикробного препарата, действующей против микроорганизма).

Результаты. Антибиотикорезистентность штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных в период 2017-2018 гг. составила: бензилпенициллин 16,6%, ципрофлоксацин 30,5%, азитромицин 13,8% (с умеренной чувствительностью 33,3%), тетрациклин 30,5%, гентамицин 0% (с умеренной чувствительностью 44,4%), цефиксим 5,5%, 0% резистентности показали спектиномицин и цефтриаксон. У всех 36 изолятов был отрицательный тест на β-лактамазу. Показатели резистентности штаммов *N. gonorrhoeae* к бензилпенициллину, ципрофлоксацину, тетрациклину остаются на стабильно высоком уровне в сравнении с периодом 2009-2013 гг. Доля штаммов нечувствительных к азитромицину падала, начиная с 2009 г. – 17,3%, до 12% в 2010 г. и 0% в 2013 г., однако показатели резистентности в период 2017-2018 гг. показывают негативную тенденцию к увеличению до 13,8% с умеренной чувствительностью 33,8%. Также растет устойчивость *N. gonorrhoeae* к цефиксиму 0,5% в 2010-2013 гг. до 5,5% в 2017-2018 гг. Резистентность к спектиномицину и цефтриаксону остаются неизменными с 2009 г. и составляют 0%. Данных по гентамицину за период 2009-2013 гг. нет.

Выводы. 100% чувствительность штаммов *N. gonorrhoeae* в отношении к цефтриаксону сохраняет его использование в качестве первой линии выбора при лечении гонореи. В связи с сохранением 100% чувствительности *N. gonorrhoeae* к спектиномицину, он может использоваться в качестве альтернативного метода лечения. Учитывая негативную динамику роста резистентности *N. gonorrhoeae* к цефиксиму необходимо с осторожностью назначать данный препарат в связи с риском увеличения резистентности. Высокие показатели резистентности штаммов *N. gonorrhoeae* к бензилпенициллину, ципрофлоксацину, тетрациклину, азитромицину и гентамицину исключают данные препараты для терапии гонококковой инфекции в Республике Беларусь.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, гонорея, антибиотикорезистентность, Беларусь.

RESULTS OF ANTIBACTERIAL RESISTANCE MONITORING FOR NEISSERIA GONORRHOEAE IN BELARUS, 2017-2018

¹Aniskevich A.V., ¹Shimanskaya I.G., ¹Golubovskaya T.N., ¹Stanislavova I.N.,
¹Suslov V.S., ²Unemo M.

¹Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

²Örebro University Hospital, Sweden

The aim of the study was to evaluate the antibiotic resistance indices of *Neisseria gonorrhoea* strains in the Republic of Belarus for the period 2017-2018 and determining the trend in their change compared to the period 2009-2013. The 100% sensitivity of *N. gonorrhoeae* strains to ceftriaxone retains its use as the first line of choice in the treatment of gonorrhea. Due to the preservation of 100% sensitivity of *N. gonorrhoeae* to spectinomycin, it can be used as an alternative treatment method. Given the negative growth dynamics of *N. gonorrhoeae* resistance to cefixime, it is necessary to prescribe this drug with caution in connection with the risk of increased resistance. High resistance rates of *N. gonorrhoeae* strains to benzylpenicillin, ciprofloxacin, tetracycline, azithromycin, and gentamicin exclude these drugs for the treatment of gonococcal infection in the Republic of Belarus.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, gonorrhea, antibiotic resistance, Belarus.

Поступили 13.09.2019

КАТЕТЕР-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИНФЕКЦИИ: ЭФФЕКТИВНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

Боронина Л.Г.

Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Российская Федерация

Введение. Диагностика катетер-ассоциированных инфекций (КАИ) – одна из главных причин ятрогенных инфекций, для которых характерен существенный уровень заболеваемости и смертности. Данная патология занимает третье место среди всех нозокомиальных инфекций и первое место среди причин бактериемии, составляя до 10% от всех инфекций у госпитализированных пациентов, 20% от всех нозокомиальных инфекций и до 87% от первичных бактериемий. Примерно у 15% пациентов после постановки центрального венозного катетера (ЦВК) развиваются механические, инфекционные или тромботические осложнения, требующие его удаления. Количество КАИ варьирует в различных по структуре и профилю отделениях и стационарах и составляет по данным различных исследований от 2,9 случаев на 1000 дней катетеризации в специализированных отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), и до 7,7 случаев у пациентов ОРИТ общего профиля.

Цель: изучить возможности ускоренных методов определения катетер-ассоциированных инфекций в детском стационаре.

Материалы и методы. Провели сравнительную оценку микробиологического исследования дистальных частей катетера методом Маки и культурального исследования на средах ALIFAX HB&L LIGHT по технологии светорассеяния для ускоренного определения возбудителей, колонизирующих венозные катетеры у пациентов ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница». Проведено исследование 2866 проб крови, 604 пробы крови из ЦВК и 171 фрагментов дистального отдела ЦВК. Применяли среды для

автоматических анализаторов (Bactec PLUS aerobic/F and anaerobic/F, Bactec Peds Plus/F Culture Vials, Bactec Mycosis-IC/F, культуры идентифицировали на ATB Expression, bioMerieux, Франция, MicroScan WalkAway 96, Siemens, Германия; ВИТЕК-2, bioMerieux, Франция).

Результаты. При подозрении на катетер-ассоциированную инфекцию или наличие признаков воспаления в месте установки катетера материалом для исследования служил центральный венозный катетер. Выявлено 146 положительных гемокультур, 25 положительных проб крови из ЦВК и 24 положительных образца дистального отдела ЦВК. Из 604 исследований крови из центрального венозного катетера положительными оказались 25 проб катетеров (4,1%), а из 171-й пробы при исследовании фрагмента дистального отдела ЦВК – 21 проба. Среди 25 положительных проб крови из ЦВК, в 21 случае (84%) кровь из периферической вены была стерильна, а из 24 положительных проб, полученных при исследовании дистального образца катетера, в 23 случаях – результат исследования пробы крови оказался отрицательным (96%). Наибольший удельный вес занимает семейство *Staphylococcaceae* (72,7%), далее порядок *Enterobacterales* (11,5%), на третьем месте семейство *Streptococcaceae* (5,8%), также встречается выделение микроорганизмов из таких семейств как: *Saccharomycetaceae* (2,9%), *Pseudomonadaceae* (2,2%), *Moraxellaceae* (2,2%), *Alcaligenaceae* (1,4%), *Neisseria* (0,7%) и *Corinebacterium* (0,7%). На катетерах обнаружены *Staphylococcus epidermidis* (69,3%, n=70), *Staphylococcus aureus* (13,9%, n=14), *Staphylococcus haemolyticus* (13,9%, n=14), *Staphylococcus intermedius* (0,7%, n=1), *Staphylococcus hominis* (0,7%, n=2). *Candida parapsilosis* выделена у недоношенного новорожденного с внутриутробной инфекцией.

При сравнении культуральных исследований катетеров по методу Maki и на средах ALIFAX HB&L LIGHT по технологии светорассеяния выявлены идентичные результаты, различия обнаружены в скорости получения результатов: оценить количественный рост микроорганизмов на приборе LIFAX HB&L LIGHT удавалось через 3 часа. Учет результатов в более ранние сроки на приборе ALIFAX HB&L LIGHT, чем при посеве на пластинчатые питательные среды, свидетельствовал об отсутствии микроорганизмов на дистальной части катетера, т.е. об отсутствии инфекции, связанной с катетером.

Ключевые слова: катетер-ассоциированные инфекции, диагностика, детский стационар.

CATHETER-ASSOCIATED INFECTIONS: EFFECTIVE APPLICATION OF MODERN DIAGNOSTIC METHODS

Boronina L.G.

Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

When comparing culture studies of catheters using the Maki method and ALIFAX HB&L LIGHT media using light scattering technology, identical results were found, differences were found in the speed of obtaining results: it was possible to evaluate the quantitative growth of microorganisms on the ALIFAX HB&L LIGHT device after 3 hours. Consideration of results at an earlier time on the ALIFAX HB&L LIGHT device than when plating on plate culture media indicated the absence of microorganisms on the distal part of the catheter - this indicated the absence of infection associated with the catheter.

Keywords: catheter-associated infections, modern diagnostic methods, children.

Поступили 11.10.2019

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДНК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЖЕЛУДКА У ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ *HELICOBACTER PYLORI*

Воропаев Е.В., Баранов О.Ю., Осипкина О.В., Зятыков А.А.,
Шафорост А.С., Платошкин Э.Н.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

Введение. Значительная часть микробных сообществ человека локализована в его желудочно-кишечном тракте, микробиом которого, помимо участия в усвоении питательных веществ из пищи, играет важную роль в метаболических и когнитивных процессах, иммунных реакциях, а его изменение приводит к развитию большого спектра заболеваний. Молекулярно-генетические исследования показали, что у здорового человека в разных анатомических областях желудка состав микробиоты не имеет существенных различий, тогда как при гастродуоденальной патологии может наблюдаться значительное изменение состава его бактериального сообщества и появление в составе микробиома новых микроорганизмов, которое в свою очередь может приводить к развитию различных заболеваний.

Цель исследования: определение доминирующей метагеномной микрофлоры у пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*, на основе использования фрагментного анализа ДНК.

Материалы и методы исследования. В исследование включены пациенты учреждений здравоохранения г. Гомеля с диагнозом гастропатия (эритематозная или неуточненная), в количестве 27 человек. В качестве материала для исследования использовались биоптаты (кусочки ткани объемом не более 5 мм³) слизистой оболочки желудка, которые были взяты во время проведения фиброгастродуоденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка.

Определение доминирующей метагеномной микрофлоры у пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*, проводили методом определения видового состава микробных сообществ с использованием анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов рДНК-маркеров, разработанным и утвержденным в Министерством здравоохранения Республики Беларусь при выполнении задания государственной программы научных исследований (инструкция по применению № 120-1118, утверждена 30.11.2018).

Данный метод является комбинированным анализом, сочетающим полимеразную цепную реакцию, эндонуклеазную рестрикцию (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), и электрофоретическую детекцию высокой степени разрешения в условиях денатурирующего полиакриламидного геля. В основе метода лежит молекулярно-генетическая оценка размеров фрагментов гипервариабельной области гена 16S рРНК бактерий.

Для выделения ДНК, проведения ПЦР, электрофоретической детекции, рестрикции, фрагментного анализа и секвенирования использовали коммерческие реагенты согласно инструкций производителя. После экстракции проводили спектрофотометрический анализ с целью определения качественных и количественных характеристик ДНК. Для дальнейшего анализа выбирали образцы, для которых соотношение экстинкций составляло: $A_{260}/A_{280} \geq 1,67$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$, $A_{320} \rightarrow 0$. Детекцию продуктов ПЦР проводили с помощью горизонтального гель-электрофореза (агарозный гель 1,7%). Для окрашивания применяли раствор бромистого этидия (концентрация 0,1-0,5 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использована вода (отсутствует амплификация); в каче-

стве положительных контрольных образцов использовали чистые бактериальные культуры с установленным видовым статусом (*Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Результаты исследования и обсуждение. По результатам ПЦР, направленной на выявление бактериальной ДНК, для каждого исследованного образца был получен электрофоретический спектр ампликонов, характеризующийся наличием нескольких фракций в диапазоне около 900 пар нуклеотидов, что свидетельствовало о содержании генетического материала более чем одного видов микроорганизмов.

Затем продукты ПЦР (ампликоны) обрабатывали рестриктазой MspI, инкубировали при 37°C не более 16 ч. Выбор именно рестриктазы MspI (HpaII) был обусловлен тем фактом, что этот фермент, распознающий сайты C[^]CGG, по предварительному анализу расщепляет искомый фрагмент генома бактерий таким образом, что даёт возможность дифференцировать достаточно большое количество разных видов бактерий, позволяя оценить основной спектр доминирующих метагеномных сообществ должным образом.

На следующем этапе проводили фрагментный анализ с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Thermo Fisher Scientific, США), используя реагенты той же фирмы. Анализ полученных результатов проводили на основании использования программного пакета GeneMapper 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Размер рестриктов определяли с помощью стандарта размера фрагментов молекулы ДНК – GS500LIZ (содержит 16 фрагментов размером 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, и 500 оснований), анализ размера происходит по оси X, по оси Y – уровень сигнала. Расчет ожидаемого размера терминальных рестрикционных фрагментов проводили с помощью программного обеспечения, представленного в открытом доступе на интернет-ресурсах (NEBcutter). Сравнительный анализ расчетных и детектируемых электрофоретических данных позволил сделать вывод о видовой принадлежности бактерий.

Для верификации и идентификации микроорганизмов применяли метод секвенирования по Сэнгеру используя специфические праймеры, для каждого из выявленных фрагментным анализом микроорганизмов, идентифицируя их при помощи международного ресурса GenBank. В результате установлено соответствие амплифицированных нуклеотидных последовательностей каждой бактерии, что подтвердило предварительные результаты, полученные с помощью фрагментного анализа ДНК.

Заключение. С использованием разработанной методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий на основании подхода, основанного на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов рДНК-маркеров, выявлена доминирующая структура микробиома желудка, у пациентов с диагнозом гастропатия, представленная широким спектром родов микроорганизмов в смешанном микробном сообществе желудка (*Actinomyces*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Helicobacter*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Lactobacillus* и др.).

Ключевые слова: метагеномный анализ, фрагментный анализ ДНК, секвенирование по методу Сэнгера, *Helicobacter pylori*.

USE OF DNA FRAGMENT ANALYSIS TECHNIQUES TO INVESTIGATE STOMACH MICROBIAL COMMUNITIES IN PATIENTS INFECTED WITH *HELICOBACTER PYLORI*

Voropaev E.V., Baranov O.Y., Osipkina V.V., Zyatkov A.A.,
Shaforost A.S., Platoshkin E.N.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Using the method of DNA fragment analysis, microbial communities were detected in biopsy samples of patients infected with *Helicobacter pylori*. The structure of the stomach microbiome in patients diagnosed with gastropathy (erythematous or unspecified) was determined. Methods of work: polymerase chain reaction, restriction analysis, electrophoretic detection, DNA fragment analysis, Sanger sequencing, history and clinical data analysis, statistical methods.

Keywords: Metagenomic analysis, DNA fragment analysis, Sanger sequencing, *Helicobacter pylori*.

Поступили 16.09.2019

КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХГВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Грибок И.А.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Введение. В Республике Беларусь сохраняется рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Согласно отделу профилактики ВИЧ/СПИД ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» показатель распространенности составил 222,7 на 100 тыс. населения (для сравнения: в 2018 г. он составлял 205,6 на 100 тыс., а в 2017 г. – 185,2 на 100 тыс.). Процентное распределение пути заражения на территории Республики Беларусь по кумулятивным данным (1987-01.04.2019) следующее: парентеральный путь 33,7%, половой путь 64,2% и на другие пути передачи (вертикальный, неустановленный) приходится 2,1% случаев [1]. Учитывая сходные пути передачи наблюдается ко-инфицирование несколькими вирусами, такими как вирусы гепатита В (ВГВ) и С, одновременно. Совместное течение нескольких заболеваний оказывает роль на клинические проявления, как одного, так и другого вируса. Так, в связи с нарушением иммунного ответа на фоне ВИЧ-инфекции, при хроническом гепатите В (ХГВ) может сочетаться более благоприятное течение заболевания с высокой репликативной активностью вируса, что в последующем может приводить к развитию фиброза и цирроза печени в более короткие сроки, чем при моно-инфекции ХГВ. Наличие ВИЧ-инфекции ухудшает прогноз в отношении выздоровления от острого гепатита В и увеличивает вероятность перехода его в хроническое течение [2]. В то же время течение ВИЧ-инфекции значительно не меняется при ко-инфекции с ВГВ [3]. При этом наблюдается увеличение частоты гепатотоксичности АРТ-препаратов в 3 раза у пациентов с хроническим гепатитом [4].

Цель: изучить клиническое течение и оценить эффективность противовирусной терапии в когорте пациентов с ВГВ/ВИЧ ко-инфекцией.

Материалы и методы исследования. В исследование включены пациенты с ко-инфекцией ВГВ/ВИЧ. Критерием включения было выявление серологическим методом ИФА HBsAg у ВИЧ-инфицированных пациентов. Так же использовались общеклинические методы и молекулярно-генетический метод (метод полимеразной цепной реакции –

ПЦР) с целью определения наличия вируса в крови и оценки проводимой терапии. Обработка данных и анализ результатов исследования были проведены с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft®, Соединенные Штаты Америки).

Результаты исследования. В исследовании принимали участие 66 пациентов, из них 40 (60,6%) мужчин и 26 (39,4%) женщин. Средний возраст пациентов составлял $36,8 \pm 6,3$ лет (от 27 до 55 лет). При анализе пути заражения ВИЧ-инфекцией 26 человек (39%) получили вирус парентеральным путем при использовании инъекционных наркотических веществ, ещё 35 человек (53%) заразилось половым путём, и у 5 человек (8%) путь инфицирования не был установлен. Пациенты проживали на территории Республики Беларусь в следующих областях: в Витебской – 7 чел (10,6%), в Брестской – 9 чел (13,6%), в Могилевской – 6 чел (9,1%), в Минской – 17 чел (25,8%), в Гомельской – 12 чел (18,2%) и в городе Минске – 15 чел (22,7%).

При опросе у трети пациентов не наблюдалось жалоб. Среди оставшихся 64% пациентов на первый план выходили жалобы на повышенную утомляемость (у 71%), тяжесть/дискомфорт в правом подреберье (у 59%), снижение аппетита – 31%, кожный зуд (у 4%). В клинической картине в 84% случаев отмечалась гепатомегалия, у 12% – спленомегалия. Распределение по уровню клинико-биохимической активности среди пациентов с ВГВ/ВИЧ ко-инфекцией было следующим: ХГВ с минимальной активностью 60,6% (40/66), ХГВ с умеренной активностью 21,2% (14/66), ХГВ с высокой активностью 18,2% (12/66). В среднем отмечалось незначительное повышение биохимической активности АЛТ (1,25N), АСТ (61,8 ЕД/л, при норме до 50 ЕД/л), ГГТП (98,5 ЕД/л, при норме до 55 ЕД/л) и общего билирубина (17,75 мкмоль/л, при норме до 17 мкмоль/л). Уровень щелочной фосфатазы в крови в среднем был в пределах нормы. По стадии ВИЧ-инфекции пациенты распределялись приблизительно равным образом, за исключением 4 стадии: 1 клиническая стадия 28,8% (19/66); 2 клиническая стадия 30,3% (20/66); 3 клиническая стадия 27,3% (18/66); 4 клиническая стадия 13,6% (9/66).

На период исследования 75,76% пациентов получали антиретровирусную терапию (АРТ), из них 31 (62%) мужчина и 19 (38%) женщин. Наиболее часто используемыми препаратами, входящими в схему АРТ были: ламивудин, эфавиренц, тенофовир, зидовудин и эмтрицитабин. При обследовании методом ПЦР ДНК ВГВ у 54,5% пациентов вирус не детектировался в крови, что говорит об эффективности проводимой терапии также в отношении вируса гепатита В, т.к. используемые препараты обладают противовирусной активностью против обоих вирусов.

Выводы:

1. Среди пациентов преобладают мужчины 30-40 лет с преимущественно половым путем заражения.
2. Гепатит В среди данной группы пациентов протекает с минимальной клинико-биохимической активностью.
3. Проводимая противовирусная терапия эффективна в отношении, как вируса иммунодефицита, так и вируса гепатита В.

Ключевые слова: хронический гепатит В, ВГВ/ВИЧ ко-инфекция, противовирусная терапия.

Литература

1. Эпидситуация по ВИЧ, 2019 [Электронный ресурс] // Эпидситуация по ВИЧ-инфекции в Республике Беларусь на 1 апреля 2019 года. – Режим доступа: <https://www.belaid.net/epidsituaciya-po-vichspid-v-belarusi/>. – Дата доступа: 23.05.2019.

2. Bodsworth, N.J. The influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the development of the hepatitis B virus carrier state / N.J. Bodsworth, D.A. Cooper, B. Donovan // J. Infect. Dis. – 1991. – Vol. 163, No. 5. – P. 1138-1140.

3. Hepatitis B and HIV: prevalence, AIDS progression, response to highly active antiretroviral therapy and increased mortality in the EuroSIDA cohort / D. Konopnicki [et al.] // AIDS. – 2005. – Vol. 19, No. 6. – P. 593-601.

4. HIV Medicine: 15th ed. [Electronic resource] / Eds.: C. Hoffmann, J.K. Rockstroh, B.S. Kamps. – Paris: Cagliari, Wuppertal, 2007. – 818 p. – Mode of access: <http://hivmedicine.com/hivmedicine2007.pdf>. – Date of access: 17.09.2019.

CLINICAL COURSE AND EFFICIENCY OF ANTIVIRAL THERAPY OF HBV IN HIV-INFECTED PATIENTS

Gribok I.A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

HBV/HIV co-infection has an effect on the clinical manifestations of both diseases. Mild course of HBV in the presence of a virological activity can lead to a high risk of liver fibrosis progression, liver cirrhosis and hepatocellular cancer. The evaluation of the course of chronic hepatitis B in HIV-infected patients and appropriate treatment can prevent such severe complications.

Keywords: chronic viral hepatitis B, co-infection HBV/HIV, antiviral therapy.

Поступили 17.09.2019

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И АНТИФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ БАЗИДИАЛЬНЫХ КСИЛОТРОФНЫХ ГРИБОВ

¹Дегтярёва Е.И., ²Коваленко С.А., ¹Рубаник Т.Ф.

¹*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь*

²*Государственное научное учреждение «Институт леса Национальной академии наук Беларуси», Гомель, Республика Беларусь*

Введение. Базидиальные ксилотрофные грибы являются ценными пищевыми продуктами и при этом содержат целый ряд биологически активных веществ с потенциальным лечебным действием. В последние годы среди возбудителей бактериальных инфекций, очень часто встречаются бактерии с множественной антибиотикорезистентностью. В связи с этим одной из актуальных задач является поиск соединений, эффективных в отношении таких бактерий. Представляют интерес вещества, полученные из экстрактов плодовых тел и мицелия, культивируемых базидиальных грибов (вторичные метаболиты, локализованные внутриклеточно). В результате многочисленных исследований, было показано, что высшие базидиомицеты могут стать источниками для получения лекарственных препаратов, обладающих новыми механизмами противомикробного действия [1]. В отличие от обычных лекарств, экстракты из грибов не токсичны и не дают отрицательных побочных эффектов даже при приеме больших доз. Препараты из грибов улучшают самочувствие человека, оказывая общее тонизирующее действие на организм, и, тем самым, повышают качество жизни человека. В последние 30-40 лет наибольший интерес исследователей вызывают грибные экзополисахариды макромицетов, относящиеся к группе гликанов. Действие гликанов проявляется опосредованно через иммунную систему, что делает грибные метаболиты весьма привлекательными при создании

лечебных препаратов. В странах Востока уже созданы и используются лечебные средства на основе грибных гликанов, гликан-пептидов, как нативных, так и модифицированных, в том числе содержащих различные добавки [2]. В качестве сырья для получения грибных препаратов используются виды базидиомицетов из родов *Lentinula spp.*, *Ganoderma spp.*, *Hericiium erinaceus spp.*, *Auricularia spp.*, и др. Одними из перспективных объектов, для выращивания и создания функциональных лечебно-профилактических препаратов, являются такие ценные лекарственные грибы, как аурикулярия густоволосистая (*Auricularia polytricha (Mont.) Sacc.*), гериций гребенчатый (*Hericiium erinaceus (Bull.) Pers.*), сиитаке (*Lentinula edodes (Berk.) Pegler*), трутовик лакированный (*Ganoderma lucidum (Curt.) P. Karst.*). Спектр биологического действия этих грибов очень широк [3].

Цель исследования – изучение антибактериальных и антифунгицидных свойств водных, спиртовых, ацетоновых экстрактов, полученных из плодовых тел базидиальных ксилотрофных грибов.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследований использовали чистые культуры из коллекции штаммов грибов ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»: штамм 185 *Lentinula edodes (Berk.) Pegler*; штамм 335 *Ganoderma lucidum (Curt.) P. Karst.*; штамм 287 *Hericiium erinaceus (Bull.) Pers.*; штамм 174 *Auricularia polytricha (Mont.) Sacc.* В лаборатории генетики и биотехнологии ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», в результате генетической идентификации в 2017 г. подтверждена видовая принадлежность штаммов посредством использования секвенирования рибосомального оперона ядерной ДНК базидиальных грибов.

Для получения вторичных метаболитов из сухих плодовых тел базидиальных ксилотрофных грибов экстракцию проводили водой, этиловым спиртом и ацетоном в соотношении 1:10 (10 г измельчённых при помощи лабораторной мельницы высушенных грибов экстрагировали в 100 мл дистиллированной воды, этилового спирта или ацетона) в стерильных флаконах. Флаконы помещали на 12 ч в термостат при температуре 37°C, затем в шейкер на 24 ч при температуре 37°C с 140 оборотами в час. Через сутки экстракты из плодовых тел базидиальных грибов фильтровали через бактериальные фильтры. После фильтрации из спиртовых и ацетоновых экстрактов растворитель испаряли при комнатной температуре под вытяжкой. Сухие спиртовые и ацетоновые экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). Для тестирования были использованы суточные культуры 5 штаммов бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 641, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 844, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1049, *Escherichia coli* ATCC 845 и *Proteus mirabilis* ATCC 2785 и 1 штамм грибов рода *Candida*: *Candida albicans* ATCC 10231. Из суточных культур тестируемых микроорганизмов, выращенных в чашках Петри на ГРМ-агаре (бактерии) и среде Сабуро (кандиды) в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили бактериальные суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд ($1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). На тестируемые культуры, засеянные газоном, раскапывали полученные экстракты и чашки Петри инкубировали в термостате в течение 24ч при 37°C. После 24-часовой инкубации оценивали рост микроорганизмов и зоны диаметров отсутствия роста в местах нанесения экстрактов.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведенного исследования были изучены антибактериальные и антифунгицидные свойства водных экстрактов, полученных из плодовых тел базидиальных грибов: *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Auricularia polytricha*. Установлено, что водные экстракты из плодовых тел *Lentinula edodes*, *Hericium erinaceus*, *Auricularia polytricha* не обладают антибактериальными и антифунгицидными свойствами. Однако было отмечено, что водный экстракт из плодовых тел *Ganoderma lucidum* блокирует рост и развитие бактерий вида *Klebsiella pneumoniae*, а также проявляет антифунгальную активность в отношении грибов вида *Candida albicans*.

Отмечена антибактериальная активность спиртовых и ацетоновых экстрактов из плодовых тел *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Auricularia polytricha* в отношении *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, экстракты *Lentinula edodes* не были активны в отношении всех тестируемых культур. Антимикробная активность экстрактов в отношении *Staphylococcus aureus* отсутствовала.

Заключение. Анализируя полученные данные, можно заключить, что наиболее перспективными источниками сырья для биотехнологической фармакологии могут служить трутовик лакированный (*Ganoderma lucidum* (Curt.) P. Karst), аурикулярия густоволосистая (*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.), гериций гребенчатый (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.). Требуется проведение дальнейших исследований для идентификации вторичных метаболитов *Ganoderma lucidum* (Curt.), *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.), (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.), проявляющих антибактериальные и антифунгицидные свойства.

Ключевые слова: ксилотрофные грибы, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*.

Литература

1. Wasser, S.P. Therapeutic effects of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S.P. Wasser, A.L. Weis // Critical Rev. Immunol. – 1999. – Vol. 1. – P. 65-96.
2. Антимикробные свойства базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* / О.В. Ефременкова [и др.] // Успехи медицинской микологии. – Т. 7 – М.: Национальная академия микологии, 2006. – С. 280-281.
3. Medicinal properties of *Hericium erinaceus* and its potential to formulate novel mushroom-based pharmaceuticals / S. Jiang [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 98. – P. 7661-7670.

ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGICIDE ACTIVE EXTRACTS FROM FRUIT BODIES OF XYLOTROPHIC BASIDIAL FUNGI

¹Degtyareva E.I., ²Kovalenko S.A., ¹Rubanik T.F.

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

²Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

The antibacterial and antifungal activity of extracts of varnished tinder fungus (*Ganoderma lucidum* (Curt.) P. Karst), densely hairy auricularia (*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.), comb gerium (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.) against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* was identified. Further studies are required to identify secondary metabolites of *Ganoderma lucidum* (Curt.), *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc., *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., exhibiting antibacterial and antifungal properties.

Keywords: xylotrophic basidial fungi, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*.

Поступили 13.09.2019

ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ХВГС-ВИЧ КО-ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ ПОЛУЧАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С ПРЕПАРАТАМИ ПРЯМОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ

Ерёмин С.В., Карпов И.А.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь*

Введение. Использование универсального подхода в назначении эффективной антиретровирусной терапии позволило продлить ожидаемую продолжительность жизни пациентов с ВИЧ-инфекцией и улучшить её качество, а также резко снизить СПИД-ассоциированную летальность. Согласно данным многолетних наблюдений одной из ведущих причин, не связанных с СПИД летальностью, являются заболевания желудочно-кишечного тракта, чаще ассоциированные с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС). Среди 34 млн людей, живущих с ВИЧ, порядка 4-5 млн ко-инфицированы ХВГС. В 2015 г. ВОЗ постановила целью ликвидировать вирусные гепатиты к 2030 г. и Республика Беларусь присоединилась данной к программе. В 2017 г. в Республике Беларусь начата государственная программа по элиминации ХВГС с использованием препаратов прямого противовирусного действия за счет государственных средств, что позволит снизить уровень заболеваемости гепатитом С в нашей стране и уровень смертности при ко-инфекции ВИЧ от прогрессирования заболеваний печени до терминальной стадии цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

Цель исследования – изучить особенности эпидемиологии ХВГС-ВИЧ ко-инфекции среди пациентов, получающих лечение ХВГС препаратами прямого противовирусного действия.

Материалы и методы. Для сбора и анализа данных использовались амбулаторные и стационарные карты 304 пациентов, наблюдающихся в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты. Согласно данным ВОЗ в странах Восточной Европы и Центральной Азии в популяции пациентов с ВИЧ-инфекцией процент распространенности ХВГС составляет 27%. При этом среди пациентов, не употребляющих инъекционные наркотики этот процент составляет 4-8%, а среди потребителей инъекционных наркотиков 84%. В Республике Беларусь на 1 июня 2019 г. выявлено 21 379 пациентов, живущих с ВИЧ-инфекцией, из них 5 626 пациентов с ХВГС-ВИЧ ко-инфекцией.

В настоящее исследование были включены 304 пациента, получающие лечение ХВГС препаратами прямого противовирусного действия. Все пациенты, включенные в исследование, принимали антиретровирусную терапию и имели неопределяемую вирусную нагрузку ВИЧ. Использовались следующие комбинации противовирусных препаратов: софосбувир/ледипасвир +/- рибавирин, софосбувир/даклатосвир +/- рибавирин, софосбувир/велпатасвир курсами от 12 до 24 недель. Используемые схемы лечения применились согласно отечественных и международных рекомендаций.

Средний возраст пациентов, включенных в исследование, составил 38 лет. Распределение по полу: мужчины – 203 (66,78%), женщины – 101 (33,22%). Основные пути инфицирования: потребители инъекционных наркотиков – 239 (78,62%), половой путь – 55 (18,09%), мужчины, практикующие секс с мужчинами – 4 (1,32%), не установленный – 6 (1,97%). Распределение по клиническим стадиям ВИЧ было следующим:

I ст. – 181 (59,54%), II ст. – 55 (18,09%), III ст. – 44 (14,47%), IV ст. – 24 (7,859%). Среднее количество CD4 составило 546 кл/мкл (минимальное – 4, максимальное – 3 272).

При исследовании генотипов HCV 1 генотип вируса был выявлен у 146 пациентов (48,03%), 2 генотип – у 7 (2,30%), 3 генотип – у 139 (45,72%), 4 генотип – 7 (2,30%), у 5 пациентов были выявлены микст-генотипы (1,64%). Согласно данных эластометрии получены следующие результаты по выраженности фиброза/цирроза печени: F0-1 – 206 (67,76%), F2 – 61 (20,07%), F3 – 15 (4,93%), цирроз – 22 (7,24%), среди них класс тяжести А – 10, класс тяжести В – 7, класс тяжести С – 5. Среди исследуемой группы 7 пациентов ранее получали лечение ХВГС препаратами: алфа-интерферон (короткого действия или пегелированные) + рибавирин.

Выводы:

1. Среди пациентов с ХВГС-ВИЧ ко-инфекцией включенных в исследование основным путем инфицирования являлось употребление инъекционных наркотиков.

2. В исследуемой группе ХВГС-ВИЧ ко-инфекция чаще встречается среди мужчин – 203(66,78%), чем у женщин – 101(33,22%).

3. Наиболее частые генотипы HCV в популяции ВИЧ-ко-инфицированных пациентов являются 1 (n=146, 48,03%) и 3 (n=139, 45,72%) генотипы HCV.

4. Учитывая ранее выявление ВИЧ-инфекции, отсутствие выраженной прогрессии ВИЧ и использование высокоактивной антиретровирусной терапии у двух третей пациентов, включенных в исследование, отмечается отсутствие либо минимальный фиброз печени, что позволяет ожидать высокий процент эффективности лечения ХВГС-инфекции у пациентов исследуемой группы.

Ключевые слова. ВИЧ-инфекция, хронический вирусный гепатит С, эпидемиология, препараты прямого противовирусного действия, Минск, Беларусь.

EPIDEMIOLOGY OF HCV-HIV CO-INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS AMONG PATIENTS RECEIVING ANTIVIRAL TREATMENT OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS C WITH DIRECT ACTING ANTIVIRALS

Yeremin S.V., Karpov I.A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The aim of the investigation was to study the epidemiology of chronic HCV and HIV co-infection among patients receiving direct antiviral drugs for treatment of chronic HCV. The results obtained were: 1) among the patients with HCV-HIV co-infection included in the study, the main route of infection was injecting drug use; 2) co-infection occurred more common among men – 203 (66.78%) than in women – 101 (33.22%) in the study group of HCV-HIV; 3) the most common HCV genotypes in the population of HIV-infected patients were 1 (n=146, 48.03%), and 3 (n=139, 45.72%); 4) given the earlier detection of HIV infection, the absence of pronounced HIV progression and the use of highly active antiretroviral therapy in two thirds of the patients included in the study, there is a lack or minimal liver fibrosis, which allows us to expect a high percentage of treatment for chronic HVC infection in patients of the study group.

Keywords: HIV infection, chronic viral hepatitis C, epidemiology, direct acting antivirals, Minsk, Belarus.

Поступили 16.09.2019

УРОВЕНЬ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА КАК ПРЕДИКТОР НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ: РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ

Захарова А.Г., Доценко Э.А.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Введение. Холестерин является структурно-функциональным компонентом клеточных мембран, структурной основой для образования желчных кислот, стероидных и половых гормонов. Таким образом, его можно отнести к ключевой молекуле метаболизма, реагирующей на различные изменения в организме [1].

Существуют диаметрально противоположные точки зрения на безопасный уровень концентрации общего холестерина в кровотоке. Согласно классическим представлениям, повышенное содержание в крови холестерина являются важнейшим фактором риска атеросклероза и патогенетически связанных с ним заболеваний сердечно-сосудистой системы. Самый низкий уровень смертности от ИБС наблюдается при концентрации общего холестерина ниже 5,2 ммоль/л [2]. С другой стороны, для оптимального функционирования иммунной системы человека уровень общего холестерина должен быть в пределах 6,0-6,5 ммоль/л. Так, было установлено, что снижение концентрации общего холестерина ниже 3,9 ммоль/л ведёт к уменьшению уровня субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+) у здоровых лиц и, соответственно, к нарушению функционирования иммунной системы организма [3, 4].

Цель – изучить особенности липидного обмена у пациентов, умерших в условиях стационара.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ 435 медицинских карт умерших в УЗ «6 Городская клиническая больница» пациентов в возрасте 18-70 лет в период 2015-2017 гг. Изучен уровень общего холестерина при поступлении пациентов в стационар (начальная точка), его изменение в динамике заболевания и за 2-3 дня до наступления летального исхода (конечная точка). Кроме того, изучены анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные данные умерших пациентов. Согласно критериям включения (летальный исход в условиях стационара в установленные сроки, возраст пациентов от 18 до 70 лет, наличие однократного, а также в динамике, исследования уровня общего холестерина у исследуемых пациентов), отобрано 177 пациентов, из них 68,6% мужчины, 31,4% женщины. Средний возраст пациентов – 59,0±7,42 года.

Результаты исследования. Средний уровень общего холестерина при поступлении в стационар составил 4,63±1,2 ммоль/л. При этом исходно гипохолестеринемия (общий холестерин <3,0 ммоль/л) наблюдалась у 17,5% пациентов (31 пациент), нормохолестеринемия (общий холестерин 3-5,2 ммоль/л) – у 50,8% (90 пациентов), гиперхолестеринемия (уровень общего холестерина >5,2 ммоль/л) – у 31,7% (56 пациентов).

В динамике уровень общего холестерина был определен у 105 пациентов (59,3% пациентов). Средний уровень общего холестерина при поступлении (начальная точка) в данной группе пациентов составил 4,89±1,21 ммоль/л. Средний уровень холестерина в конечной точке составил 4,25±1,39 ммоль/л (снижение уровня общего холестерина от начальной к конечной точке на 13,1%). При этом в конечной точке (за 2-3 дня до летального исхода) гипохолестеринемия наблюдалась у 24,7% (26 пациентов), нормохолестеринемия – у 41,9% (44 пациентов), гиперхолестеринемия – у 33,3% (35 пациентов). Таким образом, при исследовании уровня общего холестерина по конечным точкам, наиболее близким к летальному исходу, увеличивается процент гипохолестеринемий на 7,2 %.

Также был исследован уровень общего холестерина в каждой нозологической группе при поступлении в стационар и в динамике по мере приближения к летальному исходу. Исходно наиболее низкий уровень общего холестерина выявлен в группе пациентов, умерших от гнойно-септических заболеваний – 3,94 ммоль/л. При этом во всех нозологических группах наблюдалось снижение уровня общего холестерина по конечным точкам, наиболее выраженное в группах пациентов, умерших от заболеваний печени и желчевыводящих путей (на 14,1% от исходного), сердечно-сосудистых заболеваний (на 11,9 % от исходного).

Выводы:

1. По результатам исследования было выявлено снижение уровня общего холестерина на 13,1% от исходного уровня по мере приближения пациентов к летальному исходу.

2. Исходно наиболее низкий уровень общего холестерина наблюдался в группе пациентов с гнойно-септическими заболеваниями.

3. Наиболее выраженное снижение уровня холестерина в динамике по мере приближения к летальному исходу наблюдалось в группах пациентов, умерших от заболеваний печени и желчевыводящих путей, и сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: холестерин, гипохолестеринемия, неблагоприятный исход.

Литература

1. Холестерин сыворотки крови и состояние системы иммунитета / А.А. Чиркин [и др.] // Журн. микробиол. – 2002. – № 6. – С. 99-105.

2. Лескол и коронарный атеросклероз: по результатам трёх контролируемых исследований (LCAS, FLARE, LIPS) / А.В. Сусеков [и др.] // Междунар. мед. журн. – 2002. – № 3. – С. 225-232.

3. Чиркин, А.А. Диагностика, лечение и профилактика сердечно-сосудистых заболеваний / А.А. Чиркин, В.В. Шварёнок, Э.А. Доценко. – Минск: ОДО «Триолета», 2003. – 400 с.

4. Immune system differences in men with hypo- or hypercholesterolemia / M.F. Muldoon [et al.] // Clin. Immunol. Immunopathol. – 1997. – Vol. 84. – P. 145-149.

LEVEL OF GENERAL CHOLESTEROL AS A PREDICTOR OF UNFAVORABLE OUTCOME IN HOSPITALIZED PATIENTS: A RETROSPECTIVE ANALYSIS

Zakharova A.G., Dotsenko E.A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Changes in lipid metabolism can be observed in various pathological conditions. It is known that the level of total cholesterol, LDL, HDL is significantly lower in patients with various diseases, including severe infectious diseases, burns, malignant processes, and septic conditions. The degree of decrease in total cholesterol reflects the severity of the inflammatory response and metabolic dysregulation, deviations in the level of cytokines, the severity of the disease and organ dysfunction, and can be used as a prognostic indicator. In this regard, it was of interest to study the level of total cholesterol and its change in dynamics in patients with various pathologies.

Keywords: cholesterol, hypocholesterolemia, unfavorable outcome.

Поступили 30.08.2019

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АРОБОВИРУСОВ ОТ КОМАРОВ РАЗНЫХ ВИДОВ

¹Игнатъев Г.М., ¹Антонова Л.П., ¹Каа К.В., ⁴Жиренкина Е.А.,
²Самарцева Т.В., ³Оксанич А.С.

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова», посёлок Института полиомиелита, поселение Московский, Москва, Российская Федерация

²Научно-исследовательский Институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Российская Федерация

³ЗАО БТК «Биосервис», Боровск, Калужская область, Российская Федерация

⁴ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток» ФМБА России, Санкт-Петербург, Красное Село, Российская Федерация

Введение. Комары различных родов являются переносчиками целого ряда возбудителей вирусных заболеваний, прежде всего относящихся к арбовирусам (альфа- и флавивирусы). Ареал распространения комаров родов *Aedes spp*, *Culex spp*, *Culiseta spp* не ограничивается странами, расположенными в тропической и субтропической зонах. Комары этих видов определяются в странах с умеренным климатом в Южном и Северном полушариях. В связи с этим возрастает вероятность смены переносчика, что, в свою очередь, может приводить к изменениям инфекционности вирусов для человека. Учитывая растущую выявляемость вирусов, переносимых комарами и их патогенность для человека разработка средств профилактики и лечения заболеваний, вызываемых альфа- и флавивирусами, остается актуальной.

Целью работы было выделение и идентификация арбовирусов от комаров.

Материалы и методы. Комары были отловлены в сухой сезон в лесной зоне с координатами 12.325527N 85.974662W и 12.323326 N 85.974275W. Выделение вирусов проводилось на клетках С6/36. Идентификация возбудителей проводилась с использованием: ИФА-наборов БиоСкрин-Денге (Ag), БиоСкрин-Чикунгунья (Ag), БиоСкрин-ВЗН (Ag), БиоСкрин-Синдбис (Ag) (производства БТ-Биосервис, Россия) и ОТ-ПЦР со специфическими праймерами. Секвенирование по Сэнгеру.

Результаты. Всего было исследовано 102 комара относящихся к трем родам – *Culex spp*, *Culiseta spp*, *Aedes spp*. Наибольшее количество комаров относилось к роду *Aedes*, представленному видами *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*. Комары каждого вида или рода были разделены на пулы по 4-5 особей в пуле. Каждый из образцов пула прошел четыре последовательных пассажа на клетках С6/36. Контроль за состоянием монослоя клеток проводили под микроскопом в течение пяти дней после пассажа. При исследовании суспензий только двух пулов комаров, полученных от *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, начиная с третьего пассажа отмечены изменения монослоя клеток С6/36. После пятого пассажа на клетках С6/36 материалы указанных пулов были исследованы в ИФА. В пулах *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* в материалах всех исследованных пассажей не выявлены антигены вирусов Западного Нила и Синдбис. В то же время в материалах суспензии, полученной из пула *Aedes albopictus* начиная с 4 пассажа выявляется антиген вируса Чикунгунья. В материалах, полученных из пула *Aedes aegypti* на пятом пассаже определяется вирус Денге. Таким образом из только в 2 из 23 исследованных пулов комаров разных родов определяются антигены вирусов Чикунгунья или Денге. Материал пятого пассажа был исследован в ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к вирусам Денге и Чикунгунья. В результате подтверждено, что изолят, полученный из комаров *Aedes albopictus* содержит РНК вируса Чикунгунья и не содержит РНК вируса Денге. Изолят, полученный от комаров *Aedes aegypti* содержит РНК вируса Денге и не содержит

РНК вируса Чикунгунья. Изолят Денге относится к субтипу 2. Изолят Чикунгунья относится к генотипу ECSA. Полученные последовательности представлены в GenBank по номерами MN271691 и MN271692.

Ключевые слова: арбовирусы, комары, выделение.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AROBOVIRUSES FROM MOSQUITOES OF DIFFERENT SPECIES

¹Ignatiev G.M., ¹Antonova L.P., ¹Kaa K.V., ⁴Zhirenkina E.A.,
²Samartseva T.V., ³Oksanich A.S.

¹*M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Preparations, Moscow, Russian Federation*

²*I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, Russian Federation*

³*"Bioservice", Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation*

⁴*St. Petersburg Vaccine and Serum Research Institute, St. Petersburg, Krasnoye Selo, Russian Federation*

Keywords: arboviruses, mosquitoes, isolation.

Поступили 29.08.2019

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕНИЯ ЯИЦ ГЕЛЬМИНТОВ И ЦИСТ ПРОСТЕЙШИХ С ПОМОЩЬЮ ГРАНУЛИРОВАННОЙ И МИКРОПЛАЗМЕННОЙ ФОРМ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ

¹Карамышева Ю.С., ²Комаров А.И., ¹Гудков В.Г., ²Орда Д.В., ²Искандарова Д.О.

¹*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь*

²*Государственное научное учреждение «Объединенный институт машиностроения Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Введение. Лабораторная диагностика ряда паразитарных заболеваний осуществляется путем выявления их возбудителей - яиц гельминтов и цист простейших в образцах биологического материала и объектах внешней среды. В процессе пробоподготовки исследуемого материала с помощью сорбционного метода осуществляется очистка и концентрирование содержащихся в нем патогенных биологических агентов (ПБА) с последующей идентификацией, чаще всего, методом микроскопии. При этом Al_2O_3 (оксид алюминия, окись алюминия) является одним из наиболее известных сорбентов, часто используемых с этой целью в лабораторной практике [1-2], в т.ч. при выделении яиц гельминтов и цист простейших [3-4]. Этот сорбент содержится и в составе набора для обнаружения яиц гельминтов и цист простейших производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Республика Беларусь) [5]. Оксид алюминия имеет различные физические формы, например, порошок, гранулы, пластины, морфологическую и молекулярную структуру, что предположительно может сказаться на эффективности выделения ПБА.

Использование сорбента в виде порошка или гранул, помещаемых в пакет из водонепроницаемого материала, как это делается при изготовлении указанных выше наборов, сопряжено с рядом недостатков. Так, материал пакетика затрудняет проникновение относительно крупных ПБА паразитарной природы, а через крупные поры порошок и даже мелкие гранулы высыпаются. Несмотря на относительно большие размеры пакетика (5x5 см), реальная площадь контакта сорбента с жидкой средой ограничивается весьма

небольшой поверхностью образовавшегося комочка сорбента. Кроме того, остатки порошка и мелкой взвеси гранулированного оксида алюминия уменьшают видимость препарата и затрудняют идентификацию искомым агентов при микроскопии этих препаратов. В качестве более удобной альтернативы распространенным сыпучим сорбентам могут рассматриваться компактные оксидные материалы с высокой удельной поверхностью. Такими свойствами обладают алюмооксидные покрытия, получаемые на алюминиевых сплавах методом микродугового оксидирования. Этот метод позволяет формировать покрытия толщиной до 300 микрон и более, при этом возможность варьирования технологическими параметрами процесса позволяет целенаправленно создавать оптимальную морфологическую структуру и пористость покрытий. Разработка подобных микроплазменных покрытий осуществляется в ГНУ «Объединенный институт машиностроения Национальной академии наук Беларуси».

Целью настоящей работы являлось изучение эффективности гранулированной и микроплазменной форм сорбента на основе оксида алюминия для выделения цист лямблии и яиц аскариды из водной суспензии.

В работе использовались 2 образца сорбентов на основе оксида алюминия. Образец 1 представлял собой гранулы Al_2O_3 в форме шарика, диаметром 0,4 - 1,2 мм, с удельной поверхностью $m. \text{кВ./г}=358$, массой 1,0 г, общий объем пор $\text{см. куб./г} = 0,6$. Изготовлен по ТУ 2163-004-81279372-11.

Образец 2 имел форму цилиндра с микроплазменным покрытием $Al_2O_3+2Al_2O_2+3SiO_2$, глубиной 330 мкм, обработанное шлифованием. Разработан и изготовлен согласно патенту [6] в лаборатории технологий модифицирования конструкционных материалов Объединенного института машиностроения Национальной академии наук Беларуси методом микродугового оксидирования на матрице из сплава АМгб.

Изучалось структурно-фазовое состояние поверхностного слоя покрытия методами рентгеноструктурного и металлографического анализов. Рентгеноструктурные исследования образцов проводились на автоматизированном комплексе на базе дифрактометра ДРОН-3М в $CuK\alpha$ -излучении с применением вторичной монохроматизации рентгеновского пучка, металлографические – с использованием микроскопов ХМ300 и МИМ-8. Проводилась также сканирующая электронная микроскопия.

Паразитологические исследования проводились с использованием двух тест-объектов ПБА: цист *Giardia lamblia* (возбудителя лямблиоза) и яиц *Ascaris lumbricoides* (возбудителя аскаридоза) из рабочей коллекции РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Готовились рабочие взвеси каждого тест-объекта ПБА с установленной концентрацией в 1 л. водопроводной воды (яйца аскариды - $19\ 750\pm 510$ ед.; цисты лямблий – $22\ 500\pm 107$ ед.).

Дизайн исследования принципиально соответствовал методике, изложенной в инструкции по применению указанного набора [5] и включал 2 основные стадии: по одному циклу сорбции обоих ПБА с помощью каждого из исследуемых сорбентов и десорбции патогенов с помощью десорбента (0,08%-ный раствор соляной кислоты),

Эффективность испытанных сорбирующих материалов рассчитывалась по формуле:

$$C = \frac{m}{n} \times 100$$
, где: C – эффективность выделения (%); m – количество возбудителей, обнаруженных после взаимодействия с сорбирующим материалом и десорбции, n – количество возбудителей в рабочей взвеси тест-объекта ПБА.

Статистическая обработка проводилась общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение. Анализ морфологии сорбционных материалов показал, что гранулированная форма состоит из округлых, близких к сферической форме гранул

размером около 1 мм. Поверхность гранул имеет сложный рельеф, образованный спеченными частицами чешуйчатой формы. Такой характер рельефа формирует развитую поверхность гранул, повышающую их сорбционную способность. При этом пористость материала отсутствует, что свидетельствует о плотном компактировании порошка в процессе спекания. Рентгеноструктурный анализ показал, что гранулы представляют собой разупорядоченные аморфизированные формы оксида алюминия.

Микроплазменное покрытие, полученное на образце из сплава АМг6, как следует из данных рентгенофазового анализа, состоит из оксида алюминия и представлено модификациями γ - Al_2O_3 и α - Al_2O_3 . Оно имеет шероховатую развитую поверхность, образованную выступающими оплавленными фрагментами и порами, возникшими в результате выхода газов в процессе формирования покрытия. Такая морфология поверхности является благоприятным фактором для использования этого покрытия в качестве сорбента.

Паразитологические исследования показали, что обе формы сорбента обладали сорбирующими свойствами по отношению к тест-объектам ПБА и после десорбции позволяли концентрировать и выделять ПБА из водной взвеси, однако эффективность сорбентов оказалась неодинаковой. Максимальная сорбционная активность в отношении яиц *Ascaris lumbricoides* ($C=86,50\%$) и цист *Giardia lamblia* ($C=55,18\%$) проявляется у сорбента с микроплазменным покрытием. Это, вероятно, обусловлено повышенной активной поверхностью, сформированной вследствие увеличения концентрации Na_2SiO_3 в электролите и введения в него углерода. Формирование комбинированной поверхности включающей наплавленные фрагменты различного размера, углубления и поры, обеспечивает наиболее эффективное улавливание микрочастиц. Гранулированная форма сорбента обусловила получение существенно менее значимых ($P < 0,05$) показателей ($35,44\%$ и $47,54\%$ соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о перспективе дальнейшей разработки, технологии изготовления и методик практического применения новых форм сорбентов на основе оксида алюминия.

Ключевые слова: микроплазменное покрытие, оксид алюминия, сорбент, цисты лямблии, яйца аскариды.

Литература

1. Сорбент на основе оксида алюминия: пат. RU 2026734 / С.Ю. Бурылин, Л.Н. Рачковская, И.И. Фролова, В.Н. Коротких, Н.С. Исайкина. – Оpubл. 20.01.1995
2. Материалы на основе оксида алюминия в качестве сорбентов кишечных вирусов и носителей культур клеток / В.Г. Гудков [и др.] // Принципы и перспективы диагностики новых и вновь появляющихся инфекционных заболеваний: ст. и тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Смолевичи, 27-28 февр. 1997 г. – Минск, 1997. – С. 78-79.
3. Скрипова, Л.В. Метод улавливания яиц гельминтов и цист простейших из источников хозяйственно-питьевого водоснабжения / Л.В. Скрипова // Мед. паразитология и паразитар. болезни. – 2005. – № 1. – С. 46-47.
4. Скрипова, Л.В. Сорбционный метод обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней / Л.В. Скрипова // Здравоохранение. – 2011. – № 12. – С. 66-67.
5. Набор для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней. ТУ ВУ 100558032.189-2010.
6. Электролит для микродугового оксидирования алюминия и его сплавов: пат. ВУ 19595 / А.И. Комаров, П.А. Витязь, В.И. Комарова. – Оpubл. 30.10.2015.

SORPTION ACTIVITY OF VARIOUS ALUMINUM OXIDE FORMS IN REGARDING TO INTESTINAL PARASITIC INFECTIONS ETIOLOGIC AGENTS

¹Karamyshava Y.S., ²Komarov A.I., ¹Gudkov V.G., ²Orda D.V., ²Iskandarova D.O.

¹Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

²Joint Institute of Mechanical Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

The sorption activity of 2 forms of the sorbent – aluminum oxide in regarding to *Lambliа* cysts and *Ascaris* eggs was studied. It was shown that the highest sorption activity was manifested in the sorbent with a microplasma coating. This is probably due to the active surface formed by using high concentration of Na₂SiO₃ in the electrolyte and the carbon introduction into it. The formation of a combined surface, including surfaced fragments of various sizes, cavities, and pores, provides the most efficient capture of pathogen micro particles. The presence of carbon in the coating increases its effectiveness when used as a sorbent. Granulated form of the sorbent were significantly less effective.

Keywords: microplasma coating, oxide aluminum, sorbent, *Lambliа* cysts, *Ascaris* eggs.

Поступили 14.10.2019

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С ГИПЕРМУКОИДНЫМ ФЕНОТИПОМ

Козлова А.И., Тапальский Д.В.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

Введение. В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) впервые опубликовала список антибиотикоустойчивых «приоритетных патогенов», представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, в котором карбапенеморезистентные *Klebsiella pneumoniae* заняли место в первой категории с критическим уровнем приоритетности по необходимости в создании новых антибиотиков. В последние годы медицинское сообщество также беспокоит появление так называемых «супербактерий», характеризующихся повышенным уровнем вирулентности и эпидемическим распространением [1]. Среди них отмечена группа гипервирулентных *K. pneumoniae* (hvKP – hypervirulent *K. pneumoniae*). Характерным признаком большинства штаммов hvKP является гипермукоидность их колоний, выявляемая с помощью string-теста [2]. Изучение биологических свойств hvKP установило их способность продуцировать капсульный полисахарид, принадлежность к K1 и другим серогруппам, наличие генов вирулентности, а также большую устойчивость к бактерицидным сывороточным факторам. Следует отметить, что молекулярно-генетическим маркером K1-серогруппы является ответственный за гиперпродукцию капсульного полисахарида ген *magA* [3]. Антибиотикорезистентность большинства гипервирулентных *K. pneumoniae* остается на низком уровне, однако в настоящее время в мире уже описаны конвергентные карбапенемазопродуцирующие штаммы hvKP, представляющие собой серьезную клинико-эпидемиологическую опасность для лиц с различным иммунным статусом [1].

Цель – изучить чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом к антибиотикам, коммерческим препаратам бактериофагов и бактерицидному действию факторов сыворотки крови человека, а также оценить уровень продукции карбапенемаз данными изолятами и их принадлежность к K1-серогруппе.

Материалы и методы. В исследование включены 124 множественно- и экстремально-антибиотикорезистентных изолята *K. pneumoniae*, выделенных в 2012-2018 гг. от госпитализированных пациентов в различных городах Беларуси. Для изолятов с выявленной устойчивостью или умеренной устойчивостью хотя бы к одному из карбапенемов методом ПЦР в режиме реального времени осуществляли детекцию генов сериновых карбапенемаз KPC, OXA-48 и металло- β -лактамаз групп VIM, IMP, NDM. Для выявления гена вирулентности *magA* использовали метод ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации (праймеры *magA-F* – GGTGCTCTTTACATCATTTGC, *magA-R* – GCAATGGCCATTTGCGTTAG, размер продукта амплификации 1283 bp) [4].

Классический и гипермукоидный фенотип определяли в string-тесте на кровяном агаре. Чувствительность к препаратам для фаготерапии производства НПО «Микроген» («Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный», «Сестафаг») оценивали капельным методом (спот-тест). Чувствительность изолятов к бактерицидному действию сыворотки крови человека определяли суспензионным методом и представляли как соотношение концентрации микробных клеток после 2-часовой инкубации с сывороткой к их стартовой концентрации, выраженное в процентах.

Статистическая обработка данных выполнялась непараметрическими методами (χ^2 -квadrat). Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Среди 124 клинических изолятов *K. pneumoniae* на основании string-теста выявлено 94 изолята *K. pneumoniae* (75,8%) с классическим мукоидным фенотипом и 30 изолятов (24,2%) с гипермукоидным фенотипом. Гипермукоидные изоляты *K. pneumoniae* обладали большей устойчивостью к сыворотке крови в сравнении с изолятами с классическим фенотипом (соответственно 30,3% и 19,1%, $p = 0,029$).

Резистентность клинических изолятов *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом к препарату «Секстафаг» составила 70,0% резистентных изолятов и 76,5% – для изолятов *K. pneumoniae* с классическим фенотипом ($\chi^2 = 0,53$, $p = 0,468$). Изоляты с гипермукоидным фенотипом также обладали меньшей резистентностью к «Бактериофагу клебсиелл поливалентному очищенному» по сравнению с изолятами с классическим фенотипом (соответственно 80,0% и 96,8%, $\chi^2 = 9,55$, $p = 0,003$).

Все включенные в исследование изоляты с классическим фенотипом являлись продуцентами карбапенемаз: OXA-48 – 66 изолятов (70,2%), NDM – 19 изолятов (20,2%), KPC – 8 изолятов (8,5%), копродукция NDM + OXA-48 – 1 изолят (1,1%). Среди гипермукоидных изолятов выявлено 12 продуцентов карбапенемаз (40,0%): OXA-48 – 9 изолятов (30%) и NDM – 3 изолята (10%). Ген вирулентности *magA*, детерминирующий принадлежность к K1-серогруппе, был обнаружен только у 6 клинических изолятов с гипермукоидным фенотипом (20,0%). Все они обладали низкой чувствительностью к коммерческим препаратам бактериофагов и не являлись продуцентами карбапенемаз. Среди изолятов с классическим фенотипом продукты амплификации гена *magA* не выявлялись.

Выводы. Показана устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови изолятов *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом. В целом выявлена низкая чувствительность всех изолятов *K. pneumoniae* к препаратам для фаготерапии. Среди гипермукоидных карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae* не обнаружено изолятов, принадлежащих к K1-серогруппе.

Ключевые слова: клебсиеллы, капсула, классический фенотип, гипермукоидный фенотип, гипервирулентность, антибиотики, бактериофаги, карбапенемазы.

Литература

1. A history of community-acquired hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* severe sepsis / C. Delatour [et al.] // *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* – 2018. – Vol. 37, No. 3. – P. 273-275.
2. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups / S. Bialek-Davenet [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 20, No. 11. – P. 1812-1820.
3. Catalan-Najera, J.C. Hypervirulence and hypermucovscosity: two different but complementary *Klebsiella spp.* phenotypes? / J.C. Catalan-Najera, U. Garza-Ramos, H. Barrios-Camacho // *Virulence.* – 2017. – Vol. 8, No. 7. – P. 1111-1123.
4. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets / J.F. Turton [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 59, Pt. 5. – P. 541-547. doi: 10.1099/jmm.0.015198-0

BIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC PROPERTIES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES WITH HYPERMUCOID PHENOTYPE

Kozlova A.I., Tapalski D.V.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

The sensitivity of “classical” and hypermucoid *K.pneumoniae* strains to antibiotics, commercial preparations of bacteriophages and the bactericidal action of human serum factors, as well as the prevalence of carbapenemase genes, was studied. The resistance of hypermucoid strains to the lytic effect of bacteriophages was revealed, the presence of acquired carbapenemase genes in 40% of them was shown. Belonging to the K1-serogroup is established only for 20% of hypermucoid strains; no K1-serogroup strains were detected among strains with a “classical” phenotype.

Keywords: *Klebsiella*, capsule, classical phenotype, hypermucoid phenotype, hypervirulence, antibiotics, bacteriophages, carbapenemases.

Поступили 13.09.2019

ДИНАМИКА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ УРОЛОГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА

Лагун Л.В., Акушевич С.А, Мишукова Ю.Д.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,
Гомель, Республика Беларусь

Введение. Инфекции мочевыводящих путей представляют серьезную проблему для специалистов урологических стационаров, актуальность которой становится все более значимой из-за распространения множественной устойчивости возбудителей инфекций мочевыводящих путей, среди которых значительную роль играет *Pseudomonas aeruginosa*, к антибактериальным средствам и дезинфектантам. В итоге возникают сложности при подборе адекватного режима антибактериальной терапии и непосредственно удлинении сроков госпитализации пациентов, возрастание стоимости проводимой терапии, увеличение летальности [1-3]. В связи с этим необходимо придерживаться системы инфекционного контроля в отделении урологии, адаптированной к современным особенностям лечебно-диагностического процесса. Систематический мониторинг устойчивости клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным средствам на региональном уровне является частью стратегии сдерживания распространения антибиотикорезистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей [4].

Цель работы – установить динамику уровней антибиотикочувствительности штаммов *P. aeruginosa*, выделенных при инфекции мочевыводящих путей.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 27 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из мочи пациентов с инфекцией мочевыводящих путей урологического отделения Гомельской областной клинической больницы в 2016-2018 гг. Результаты исследования сравнивались с полученными ранее данными мониторинга антибиотикорезистентности 36 клинических изолятов *P. aeruginosa* за период 2009-2010 гг. в данном лечебном учреждении у пациентов урологического профиля. Чувствительность исследуемых штаммов *P. aeruginosa* к антибактериальным средствам (имипенему, цiproфлоксацину, амикацину, гентамицину, цефтазидиму, цефепиму) определена диско-диффузионным методом. Для контроля качества исследований параллельно с тестированием клинических изолятов проводилось тестирование контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с рекомендациями CLSI и EUCAST. Статистический анализ выполнен с использованием STATISTICA v.6.0. Для оценки различия частоты встречаемости признаков использован χ^2 -критерий Пирсона и соответствующий ему уровень значимости. Статистически значимыми считали результаты при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. В ходе локального мониторинга антибиотикорезистентности клинически значимых микроорганизмов установлено статистически значимое снижение числа чувствительных изолятов *P. aeruginosa* в отношении имипенема с 44,7% в 2009-2010 гг. до 18,5% в 2016–2018 гг. ($p < 0,05$), цiproфлоксацина – с 31,9% в 2009-2010 гг. до 14,8% в 2016-2018 гг. ($p < 0,05$). Разница в активности амикацина также статистически значима (46,8% штаммов *P. aeruginosa*, чувствительных к амикацину в 2009-2010 гг., в сравнении с 22,2% амикациночувствительных штаммов в 2016-2018 гг., $p < 0,05$). Причины нарастания резистентности к данным антибактериальным средствам, по-видимому, связаны с широким использованием этих препаратов в клинике.

К гентамицину в изучаемые периоды чувствительность сохранялась на уровне 14,8-17,0%. Также выявлено снижение доли чувствительных штаммов *P. aeruginosa* к цефалоспорином: для цефепима с 40,4 % в 2009-2010 гг. до 37,0% в 2016-2018 гг., для цефтазидима – с 29,8% до 18,5% ($p>0,05$).

Заключение. Таким образом, при сравнении данных антибиотикочувствительности клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных при инфекции мочевыводящих путей, в изучаемые периоды отмечается невысокая активность антибактериальных средств в отношении данного уропатогена. В основном отмечена тенденция к увеличению количества резистентных штаммов с 2009-2010 гг. к 2016-2018 гг.

Ключевые слова: инфекции мочевыводящих путей, *Pseudomonas aeruginosa*, чувствительность к антибиотикам.

Литература

1. Козлов, Р.С. Селекция резистентных микроорганизмов при использовании антимикробных препаратов: концепция «параллельного ущерба» / Р.С. Козлов // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 12, № 4. – С. 284-294.
2. Перепанова, Т.С. Инфекции почек и мочевыводящих путей: современные подходы к терапии / Т.С. Перепанова // Фарматека. – 2004. – №3/4. С. 16-22.
3. Тец, В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Заболевания мочевыводящих путей / В.В. Тец. – СПб: КЛЕ-Т, 2005. – 164 с.
4. Титов, Л.П. Современные подходы к организации инфекционного контроля и микробиологического мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов: информ. материалы / Л.П. Титов, В.А. Горбунов, Т.С. Ермакова. – Минск, 2003. – Вып. 2. – 18 с.

DYNAMICS OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM UROLOGICAL HOSPITAL PATIENTS

Lagun L.V., Akushevich S.A., Mishukova Y.D.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Local monitoring of antibiotic sensitivity showed low activity of antibacterial agents against the studied *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates isolated from urinary tract infection in patients of urological hospital. The tendency to decrease the number of antibiotic-sensitive strains of *P.aeruginosa* from 2009-2010 to 2016-2018 with a statistically significant difference in the activity of imipenem, amikacin and ciprofloxacin was established. The data obtained during the study can be used to develop an algorithm for rational antibacterial therapy of urinary tract infection.

Keywords: urinary tract infections, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic sensitivity.

Поступили 13.09.2019

ЧАСТОТА И СТРУКТУРА НЕЙРОИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ В ИНФЕКЦИОННЫЙ СТАЦИОНАР

¹Матиевская Н.В., ¹Совкич А.Л., ²Ланец М.П.

¹Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Республика Беларусь

²Учреждение здравоохранения «Гродненская областная инфекционная клиническая больница», Гродно, Республика Беларусь

Введение. В современных условиях наблюдается рост заболеваемости населения инфекционными болезнями, в том числе инфекционными заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС). По данным статистики, инфекционные поражения ЦНС достигают 40% в структуре неврологической заболеваемости. Актуальность проблемы инфекционных поражений нервной системы остается высокой, не смотря на значительные достижения в изучении этиологии, патогенеза, клиники, совершенствование диагностики и лечения отдельных нозологических форм [1].

Цель – представить частоту и структуру нейроинфекций у пациентов, госпитализированных в инфекционный стационар.

Методы исследования. Выполнен ретроспективный анализ истории болезни 195 пациентов (форма № 003/У), проходивших стационарное лечение в УЗ «Гродненская областная инфекционная больница» («ГОИКБ») в 2017 и 2018 гг. с подтвержденными клинически и лабораторно инфекционными поражениями ЦНС.

Результаты и обсуждение. В 2018 г. среди 4 514 госпитализированных с инфекционной патологией доля пациентов с нейроинфекциями составила 2% (91 пациент), в 2017 г. – 104 из 4 690 пациентов (2,2%).

Среди пациентов было 62 ребенка (31,8%), взрослых – 133 пациента (68,2%). Среди детей: мальчики – 31 (50%), девочки – 31 (50%), средний возраст детей – 7 лет±11 мес. Среди взрослых – мужчины составили 64% (85 чел.), женщины – 36% (48 чел.), средний возраст – 48 лет±7 мес. Средний койко-день составил 16 суток.

Среди представленных 195 случаев нейроинфекций на долю гнойных менингитов и менингоэнцефалитов пришлось 17 пациентов (9 в 2018 г. и 8 в 2017 г.), что составило 8,7% от общего числа нейроинфекций.

Доля серозных менингитов и менингоэнцефалитов составила 91,3% от общего числа инфекционных поражений ЦНС.

По результатам клинико-лабораторной верификации нейроинфекций доля поражения ЦНС энтеровирусной этиологии составила 9,2% (18 пациентов). Среди них было 11 детей (61%), 7 взрослых (39%). Поражение ЦНС вирусом клещевого энцефалита составило 16,4% (32 пациента). Среди них не было детей, взрослые составили 100%. Доля поражений ЦНС герпесвирусами составило 8 человек (4,1%).

Выводы. В структуре инфекционной патологии доля пациентов с нейроинфекциями составила 2,1% (195 пациентов из 9 204 в период 2017-2018 гг.). В структуре нейроинфекций доминируют серозные менингиты и менингоэнцефалиты, составившие 91,3%. Среди верифицированных нейроинфекций преобладают клещевые энцефалиты, энтеровирусные менингиты и менингоэнцефалиты, а также поражение ЦНС группой герпесвирусов. Тяжесть и длительность заболеваний, отдаленные последствия и инвалидизация некоторых пациентов обуславливает особое внимание и дальнейшее изучение нейроинфекций.

Ключевые слова: нейроинфекции, структура инфекционной патологии, серозные менингиты, менингоэнцефалиты, ретроспективный анализ.

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: <https://ecdc.europa.eu/en/enteroviruses/threats-and-outbreaks>. – Date of access: 09.05.2018.
2. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe / H. Harvala [et al.] // J. Clin. Virol. – 2018. – Vol. 101. – P. 11-17.
3. Энтеровирусные инфекции в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / Т.В. Амвросьева [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. — Минск : ГУ РНПЦЭМ, 2017. – Вып. 10. – С. 10-16. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

FREQUENCY AND STRUCTURE OF NEUROINFECTIONS IN PATIENTS HOSPITALIZED IN AN INFECTIOUS HOSPITAL

¹Matievskaya N.V., ¹Sovkich A.L., ²Lanets M.P.

¹*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

²*Grodno Regional Infectious Clinical Hospital, Grodno, Republic of Belarus*

Based on a retrospective analysis of case histories at the Grodno Regional Infectious Diseases Hospital in infectious diseases the proportion of patients with neuroinfection was 2.1% (195 out of 9,204 patients in the period 2017-2018). In the structure of neuroinfections, serous meningitis and meningoencephalitis dominated, accounting for 91.3%. Among convinced neuroinfections, tick-borne encephalitis, enteroviral meningitis and meningoencephalitis, as well as the central nervous system damage by herpes viruses, predominate. The severity and duration of the diseases, the long-term effects and disability of some patients require special attention and further study of neuroinfections.

Keywords: neuroinfection, structure of infectious pathology, serous meningitis, meningoencephalitis, retrospective analysis.

Поступили 02.09.2019

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНФЕКЦИИ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ВУЛЬГАРНЫМИ И РОЗОВЫМИ УГРЯМИ, ПЕРИОРАЛЬНЫМ ДЕРМАТИТОМ И ОПТИМИЗАЦИЯ ИХ ТЕРАПИИ

Навроцкий А.Л., Раммахи Лейф Мохаммед Рида Ясеен

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Введение. Проблема эффективного лечения вульгарных и розовых угрей, периорального дерматита всегда были в центре внимания современной дерматологии. Рост заболеваемости этой патологией кожи в последние десятилетия, хроническое с частыми рецидивами течение заболеваний, недостаточная эффективность существующих методов лечения ставят проблему оптимизации обследования и терапии этих заболеваний в ряд наиболее актуальных.

Если роль инфицирования *Helicobacter pylori* в патологии гастродуоденальной зоны изучена достаточно полно, то патогенез заболеваний внежелудочной локализации до конца не исследован [1, 2]. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о возможной патогенетической роли инфекции *H. pylori* в развитии и течении заболеваний, не относящихся к органам пищеварения (атеросклероза, сахарного диабета, тромбоцитопенической пурпуры, болезни Шегрена), в том числе кожных (хроническая крапивница, атопический дерматит, кожный зуд, псориаз, красный плоский лишай, очаговая алопеция, розацеа) [3].

Цель работы – изучить структуру заболеваемости, распространенность хеликобактерной инфекции среди пациентов с вульгарными и розовыми угрями, периоральным дерматитом и оптимизировать схему терапии данной категории больных с учетом особенностей микробиологического статуса желудочно-кишечного тракта.

Материалы и методы исследования. В исследование включены амбулаторные пациенты с вульгарными и розовыми угрями, периоральным дерматитом. Обследование проводилось с помощью общеклинических методов исследования согласно действующим Клиническим протоколам диагностики и лечения больных с болезнями кожи и подкожной клетчатки (2008). При обследовании на хеликобактерную инфекцию использовались наборы реагентов для иммуноферментного выявления антител к *Helicobacter pylori*. Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Statistica, 10-я версия.

Результаты исследования и обсуждение. В группе пациентов с вульгарными угрями (1-я группа) положительные результаты на антитела к *H. pylori* имели 15 пациентов (50%), из них 9 женщин (60%). Легкая форма заболевания, вызванная *H. pylori*, была выявлена в 17% случаев, средне-тяжелая форма – в 56%, и тяжелая форма – у 33% пациентов.

Среди 17 пациентов с розовыми угрями (2-я группа) имели хеликобактерную инфекцию 8 человек (47%), в том числе 6 женщин (75%). *H. pylori* несколько чаще выявлялся у пациентов с более тяжелым течением розацеа: эритематозно-пустулезная форма у 45% и эритематозно-папулезная форма у 40% пациентов.

Обследование 8 пациентов с периоральным дерматитом (3-я группа) выявило *H. pylori* у 5 из них (62,5%), в том числе у 4 женщин (80%).

Статистически достоверных различий в наличии *H. pylori* между пациентами из разных групп выявлено не было ($p > 0,05$). Всем пациентам проведена эрадикационная терапия хеликобактерной инфекции на фоне наружной терапии. Лечение проводилось по тройной 7-дневной схеме препаратами амоксициллин, кларитромицин и омепразол.

Наблюдение за группой пациентов с вульгарными угрями в течение 3-х месяцев после лечения случаев рецидивов не выявило.

Заключение. Таким образом, установлен высокий удельный вес пациентов с вульгарными и розовыми угрями, периоральным дерматитом, имеющих хеликобактерную инфекцию. В результате оптимизации лечения (анти-хеликобактерная терапия) пациентов с угревой болезнью через 1 месяц, а у части пациентов раньше, клиническая ремиссия была достигнута у 13 человек, значительное улучшение – у одного и улучшение – у одного. Побочных эффектов эрадикационной терапии не отмечено. В течение 3-х месяцев после лечения не отмечено рецидивов заболевания ни у одного пациента.

Ключевые слова: вульгарные угри, розовые угри, периоральный дерматит, состояние желудочно-кишечного тракта, *Helicobacter pylori*.

Литература

1. Музыченко, А.П. Особенности патогенеза розацеа и периорального дерматита / А.П. Музыченко // ARS medica. Искусство медицины. – 2008. – № 5. – С. 98-99.
2. Фролова, М.В. Патоморфология угревой болезни в зависимости от болезни желудочно-кишечного тракта / М.В. Фролова, С.Н. Нимер // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. ст. II респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых, Гомель, 29-30 апр. 2010 г.: в 2-х т. – Гомель, 2010. – Т. 2. – С. 168-169.
3. Роль *Helicobacter pylori* как триггерного фактора в развитии розацеа и влияние ее эрадикации на течение дерматоза / Н.А. Слесаренко [и др.] // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2012. – № 2. – С. 33-39.

PREVALENCE OF HELICOBACTERIAL INFECTION IN PATIENTS WITH ACNE VULGARIS, ROSACEA, AND PERIORAL DERMATITIS AND OPTIMIZATION OF THERAPY

Navrotski A., Rammahi Laith Mohammed Ridha Yasseen

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The scientific literature actively discusses the effect of *Helicobacter pylori* infection of the gastrointestinal tract on the development and course of some skin diseases. For the first time in the Republic of Belarus, the prevalence of this infection was studied among patients with various skin diseases in the face. An enzyme-linked immunosorbent assay determined the immunoglobulins of classes M and G in the blood serum of 30 patients with acne vulgaris, 17 with rosacea, and 8 with perioral dermatitis. Positive results on *Helicobacter pylori* were obtained in 50%, 47% and 62% of cases, respectively. All patients underwent eradication of *Helicobacter pylori* infection during external therapy. Observation for a group of patients with acne vulgaris after treatment did not reveal any relapse cases.

Keywords: acne vulgaris, rosacea, perioral dermatitis, gastrointestinal tract condition, *Helicobacter pylori*.

Поступили 25.09.2019

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГРИБКОВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Новикова Т.П., Доценко Э.А.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь*

Введение. В работах многих авторов показан высокий удельный вес аллергии к грибам при бронхиальной астме (БА) в разных возрастных группах и различных регионах планеты [1-4]. В то же время грибковая сенсibilизация не всегда вовремя диагностируется и учитывается в качестве этиологического фактора заболевания, что является причиной недостаточной эффективности стандартных методов терапии и обуславливает актуальность и социальную значимость разработки дифференцированного подхода к диагностике и лечению грибковой бронхиальной астмы (ГБА) – одной из тяжелых форм аллергии, формирующейся от влияния биоповреждений жилых помещений [2, 4]. При этом одним из основных условий эффективности терапии является определение патогенетического варианта ГБА [3].

В этиологии ГБА наибольшую роль играют плесневые и дрожжевые грибы, споры которых имеют размеры 3-10 мкм и могут глубоко проникать в дыхательные пути [4]. Темные, влажные и плохо проветриваемые помещения являются оптимальным местом для роста грибов, они в больших количествах находятся в ванных комнатах и на кухнях. Домашние растения в горшках, требующие частой поливки, целый ряд пищевых продуктов (например, сыры) также становятся коллекторами для плесеней [3, 4]. Заболевание характеризуется постепенным началом, длительным и упорным течением. От 5 до 10% пациентов с ГБА не отвечают на адекватную базисную терапию ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС), что значительно ухудшает течение и прогноз болезни [4]. Учитывая возрастающую роль грибов в этиологии и патогенезе БА, тяжесть течения и серьезность прогноза, в настоящее время необходима разработка четких диагностических критериев микогенной аллергии и соответствующего диагностического алгоритма.

Цель исследования – изучение иммунного статуса, характеристика сенсibilизации пациентов с ГБА с выделением патогенетических вариантов ГБА.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 72 пациента, из них 40 пациентов с ГБА и 32 здоровых добровольца. Возраст пациентов от 18 до 60 лет, 42% пациентов женщины, 58% мужчины. Обследование пациентов включало: сбор жалоб, анамнеза, объективный осмотр, прик-тесты с бытовыми, эпидермальными, пыльцевыми и грибковыми аллергенами, определение специфического иммуноглобулина Е методом иммуноблотинга (RIDA Allergy Screen, «R-Biopharm», Германия). Выполнялась спирометрия, проба с бронхолитиком, пикфлоуметрия (ПФМ). Пациенты с ГБА получали сублингвальную аллергенспецифическую иммунотерапию (СЛИТ) смесью плесени домашней, производства Севафарма (Чехия) в течение 12 месяцев. Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы Statistica 6.0. Данные представлены Me, (Q25; Q75). Статистическая значимость различий между группами определена по U-критерию Мана-Уитни ($p < 0,01$).

Результаты. В результате обследования выделены следующие патогенетические варианты ГБА: моносенсibilизация к одному или нескольким видам грибковых аллергенов – группа 1 ($n=13$) и полисенсibilизация – группа 2 ($n=27$), т.е. сочетание сенсibilизации к грибковым и бытовым, эпидермальным, пыльцевым аллергенам в разных ва-

риантах. Установлено, что полисенсibilизация утяжеляет течение ГБА. В группе 2 получены достоверно более низкие значения ОФВ1 77,9 (65,8;89,4)% и ПФМ макс 445,2 (412,3;476,7) л/мин в сравнении с контрольной группой: ОФВ1 95,9 (92,8;114,2)% и ПФМ макс 512,3 (497,4;525,3) л/мин и группой 1: ОФВ1 85,4 (76,9;92,1)% и ПФМ макс 493,5 (452,6;529,3) л/мин. На фоне СЛИТ у пациентов обеих групп стабилизировалось течение ГБА, однако в группе 1 в течение 12 месяцев после окончания лечение количество обострений ГБА было в 2,6 раза, а госпитализаций в стационар в 2,3 меньше, чем в группе 2.

Выводы:

1. ГБА неоднородна, патогенетическая гетерогенность ее выражается в наличии разных вариантов сенсibilизации пациентов к разным группам аллергенов.

2. При наличии полисенсibilизации у пациентов более выражены обструктивные нарушения.

3. СЛИТ позволяет стабилизировать течение ГБА у пациентов со всеми вариантами грибковой сенсibilизации, но более стабильное течение наблюдается в группе пациентов с моносенсibilизацией.

Ключевые слова: грибковая сенсibilизация, бронхиальная астма, аллерген, иммунотерапия.

Литература

1. Доценко, Э.А. Влияние погодно-климатических условий на течение бронхиальной астмы / Э.А. Доценко, Т.Ю. Крестьянинова, Е.П. Боброва // Проблемы здоровья и экологии. – 2004. – № 2. – С. 41-48.

2. Клинические рекомендации. Бронхиальная астма / под ред. А.Г. Чучалина. – М.: Атмосфера, 2008. – 224 с.

3. Царев, С.В. Клинические особенности поллипозного риносинусита с грибковой сенсibilизацией / С.В. Царев // Журн. иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2009. – № 2. – С. 133-134.

4. Шаймуратов, Р.И. Долгосрочный прогноз бронхиальной астмы: от постановки диагноза до хронизации / Р.И. Шамуратов, А.А. Визель // Вестник современной клинической медицины. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 56-62.

FEATURES OF THE COURSE AND TREATMENT OF BRONCHIAL ASTHMA IN PATIENTS WITH DIFFERENT VARIANTS OF FUNGAL SENSITIZATION

Novikova T.P., Dotsenko E.A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Keywords: fungal sensitization, bronchial asthma, allergen, immunotherapy.

Поступили 02.09.2019

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Пархомчук О.Ю., Зверко В.В., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Введение. Растительный материал широко используется для выделения нуклеиновых кислот, в частности при получении рекомбинантных аллергенов. Однако необходимо учитывать некоторые особенности строения растительных клеток, которые могут усложнить этот процесс. Жесткая полисахаридная клеточная стенка затрудняет гомогенизацию тканей с целью освобождения клеточных компонентов. Полисахариды, полифенолы и другие вторичные метаболиты, содержащиеся в растительной клетке, при выделении рибонуклеиновой кислоты преципитируют с ней, не позволяя отделить РНК [1]. Поэтому не каждый из известных методов выделения генетического материала может оказаться эффективным применительно к растительному сырью.

Целью данного исследования явилась оценка эффективности двух методов выделения РНК из листьев березы повислой.

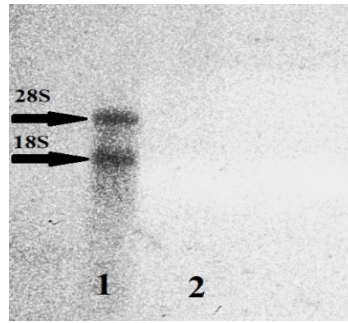
Материалы и методы. В качестве материала были использованы молодые листья березы повислой, собранные весной и замороженные в жидком азоте при -70°C . Разрушение клеточных стенок проводили механическим путем: 100 мг сырья растирали в ступке над жидким азотом стерильным пестиком.

При выделении РНК первым способом к растертым листьям добавляли 1 мл реагента TRIzol. Следующие этапы выделения РНК проводили согласно прилагаемой инструкции к коммерческому реагенту TRIzol.

Выделение РНК из второй части замороженных листьев (100 мг) проводили с использованием методики, основанной на применении LiCl [2]. В качестве лизирующего буфера использовали: 1 М Tris pH=8,0, 2,5 М NaCl, 0,5 М EDTA, 10 % SDS, 14,3 М β -меркаптоэтанол. Прогревали полученную смесь в течение 5 минут при $+50^{\circ}\text{C}$ и добавляли 75 мкл 3 М KCl. Затем инкубировали 20 мин на ледяной бане и центрифугировали (10000 об/мин, 4°C , 15 мин). К полученному надосадку добавляли LiCl до конечной концентрации 4 М и оставляли на ночь при $+4^{\circ}\text{C}$. Повторно центрифугировали (10000 об/мин, 4°C , 15 мин), полученный осадок растворяли в 200 мкл TE-буфера, добавляли равный объем фенола и хлороформа. К полученному центрифугированием надосадку (8000 об/мин, 4°C , 10 мин) добавляли NaCl до конечной концентрации 0,5 М и 2 части охлажденного при -20°C 100% этанола. Полученный после центрифугирования (10000 об/мин, 4°C , 15 мин.) осадок промывали 70% этанолом (500 мкл), подсушивали в термостате и растворяли в 50 мкл стерильной воды.

Учет результатов выделения РНК проводили методом электрофореза в 0,8% агарозном геле.

Результаты исследований. Наибольшую эффективность для выделения РНК из природного растительного материала продемонстрировал метод, основанный на применении LiCl. При применении реагента TRIzol экстракция РНК было малопродуктивной (рисунок).



1 – результаты выделения РНК методом, основанным на применении LiCl;
 2 – результаты выделения РНК методом, основанном на применении реагента TRIzol

Рисунок. – Электрофоретический анализ РНК, выделенной двумя методами

Причиной высокой результативности первого метода вероятно стала специфика применяемых реагентов: применение 10% SDS в качестве детергента и большого количества LiCl (4 М) способствовало более полной экстракции и осаждению РНК [2].

Заключение. Таким образом, учитывая эффективность метода, основанного на применении LiCl, он является более предпочтительным при выделении РНК из растительного сырья. Полученная в дальнейшем РНК была использована для постановки реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с целью получения ампликонов, кодирующих аллергены берёзы Bet v 1 и Bet v 2.

Ключевые слова: РНК, *Betula pendula*, TRIzol, LiCl.

Литература

1. Plant genomic DNA isolation: An art or a science / A. Varma [et al.] // Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 2, No. 3. – P. 386-392.
2. Isolation of total RNA from pollens / K. Bijli [et al.] // Preparat. Biochem. Biotechnol. – 2001. – Vol. 31, No. 2. – P. 155-162.

COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO METHODS FOR RNA ISOLATION FROM PLANT RAW MATERIALS

Parkhamchuk O.Yu., Zverko V.V., Grigoryeva E.E., Fomina E.G.

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

A comparative analysis of two methods for the isolation of RNA from plant materials – young leaves of birch drooping (*Betula pendula* Roth.). The method based on the use of LiCl was the most efficiency in comparison with the method based on the use of TRIzol.

Keywords: RNA, *Betula pendula*, TRIzol, LiCl.

Поступили 11.09.2019

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОЯВЛЕНИЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА КОКЛЮША В УСЛОВИЯХ ВНЕДРЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

¹Раевская И.А., ¹Шилова М.А., ²Потакова Л.М.

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение «Центр гигиены и эпидемиологии Заводского района г. Минска», Минск, Республика Беларусь

Введение. Коклюш – инфекция, выявление заболеваний которой в последнее десятилетие в значительной мере происходит благодаря внедрению в практику более чувствительных, чем бактериологический, методов лабораторной диагностики – полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА). Более пристальное внимание к этой инфекции позволило выявить изменения в проявлениях эпидемического процесса, характерных для наших дней [1].

Цель: выявить и проанализировать особенности проявлений эпидемического процесса коклюша в Заводском районе г. Минска в условиях внедрения новых методов лабораторной диагностики (ПЦР, ИФА).

Материалы и методы. Использовались данные форм официального учета и регистрации случаев коклюша в Республике Беларусь и в Заводском районе г. Минска. Основой методологии послужило наблюдательное аналитическое исследование проявлений эпидемического процесса на анализируемой территории с использованием приемов эпидемиологической диагностики и статистического анализа. Электронные базы данных создавались и обрабатывались в программе Microsoft Excel 10.

Результаты и их обсуждение. В Республике Беларусь рост заболеваемости коклюшем отмечается с 2007 года. Внедрение в диагностику ПЦР и ИФА проходило с 2012-2013 гг. В анализируемом интервале времени (2007–2018 гг.) имеет место выраженная тенденция к росту заболеваемости ($T_{пр.} = 16,0\%$) при ее колебаниях от 0,96 на 100000 населения в 2009 году до 6,83‰₀₀₀₀ в 2018 году. Заболеваемость детей 0-17 лет в 2018 году составила 33,5 на 100000 детского населения [2].

Коклюш относится к вакциноуправляемым инфекциям, но вакцинация или перенесенное заболевание коклюшем не обеспечивают длительный иммунитет. Согласно исследованиям В. Л. Колодкиной и соавт. 85,0% из обследованных жителей Республики Беларусь в возрасте от 6 месяцев до 68 лет были привиты, но только 17,5% из них имели антитела в защитных титрах, при этом наименее защищенными являлись дети 0-9 лет. Среди непривитых антитела в защитных титрах отсутствовали у всех детей в возрасте 0-4 года, в остальных возрастных группах их выявляли у 15,0–33,0% обследованных. Высокий уровень антител у привитых сохраняется около двух лет, после чего наблюдается его снижение, т. е. защитные титры у получивших законченный курс прививок от коклюша 6–7 лет назад, возможно, свидетельствуют о недавно перенесенной инфекции [3]. Вакцинация не исключает возможность заболевания коклюшем, но может смягчить характер его клинических проявлений [2]. Стоит отметить, что у 15-16% вакцинированных лиц поствакцинальный иммунитет не формируется даже при наличии полного курса прививок, т. о. реальная эффективность вакцинации у привитых оказывается не выше 40% [4].

Согласно данным наших исследований в структуре болеющих доминируют школьники и дети первых двух лет жизни, при этом значительна доля детей, привитых согласно календарю прививок и заболевших в интервале 6-15 лет от последней привив-

ки по схеме за 6–15 лет до заболевания. Заболевшие дети 3–4 месячного возраста зачастую не успевают получить прививку.

Недостаточная длительность и напряженность поствакцинального иммунитета способствует образованию очагов коклюша в организованных коллективах – организациях дошкольного образования и школах. В ряде этих коллективов имели место множественные очаги. Отмечались заносы инфекции в такие коллективы из семейных очагов и наоборот.

Заключение. В течение последних лет наблюдается увеличение активности эпидемического процесса коклюша как в Республике, так и в отдельных ее регионах. Отмечается ярко выраженная очаговость в течении эпидемического процесса коклюша. Выявлены вспышки как в организованных коллективах, так и в семьях. Среди болеющих отмечается значительная доля детей, привитых согласно календарю прививок и заболевших в интервале 6-15 лет от последней прививки.

Считаем, что более широкое внедрение таких новых методов лабораторной диагностики как ИФА и ПЦР, позволили оптимизировать работу эпидемиологов и врачей общей практики благодаря своевременному установлению диагноза в очагах коклюшной инфекции.

Ключевые слова: коклюш, эпидемический процесс, ИФА, ПЦР.

Литература

1. Фисенко, Е.Г. Иммуноструктура к коклюшу среди детского населения г. Минска / Е.Г. Фисенко, В.А. Логотько, И.Н. Глинская // Мед. журн. – 2012. – № 3. – С. 128-131.
2. Гаврилова, О.А. Особенности клинической картины коклюша у привитых и непривитых детей / О.А. Гаврилова, А.А. Астапов // Мед. журн. – 2019. – № 3. – С. 8-13.
3. Колодкина, В.Л. Выявление антител к коклюшному токсину у населения Беларуси / В.Л. Колодкина, В.С. Мартынов, Т.Н. Денисевич // Здоровоохранение. – 2012. – № 9. – С. 35-38.
4. Применение ингаляционных глюкокортикоидов при лечении коклюша у детей / А.П. Кудин [и др.] // Мед. журн. – 2013. – № 4. – С. 125-128.

TRANSFORMATION OF THE PERTUSSIS EPIDEMIC PROCESS MANIFESTATIONS IN THE CONDITIONS OF THE LABORATORY DIAGNOSTICS MODERN METHODS IMPLEMENTATION

¹Rayeuskaya I.A., ¹Shylava M.A. ²Potakova L.M.

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Center for Hygiene and Epidemiology of the Zavodskoy District in Minsk, Minsk, Republic of Belarus*

This study was conducted to analyze the characteristics of the whooping cough epidemic process manifestations in one of the Minsk districts in the context of the introduction of new laboratory diagnostic methods (PCR, ELISA). Since 2007, there has been an increase in the incidence of pertussis in the Republic of Belarus (rate of increase is 16.0%). Among the sick there is a significant proportion of children vaccinated according to the scheme for 6-15 years before the disease, as well as children of pre-vaccination age.

Keywords: whooping cough, epidemic process, ELISA, PCR.

Поступили 30.09.2019

СОСТОЯНИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ, ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА, И ПОПОЛНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Семенов С.Ф., Самойлова Т.И., Красько А.Г., Петкевич А.С.,
Родионова Л.П., Шипуль В.Н.**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Специализированная коллекция вирусов и бактерий, патогенных для человека (далее – Коллекция) государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (далее – Центр) была создана как авторизованная коллекция в 1995 г. для сохранения и поддержания штаммов микроорганизмов, выделенных в результате научных исследований, которые выполнялись в нашей стране, начиная с 1960 г.

Юридический статус Коллекции был придан в 2001 г., когда Республика Беларусь официально присоединилась к Будапештскому договору от 28.04.1977 о международном признании депонирования микроорганизмов. В данном договоре заложены основные принципы депонирования штаммов микроорганизмов в авторизованных коллекциях для целей патентной процедуры. Наша страна присоединилась к этому договору принятием Указа Президента Республики Беларусь от 15.05.2001 № 262 «О присоединении Республики Беларусь к Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры».

При этом Институт микробиологии НАН Беларуси был определен национальным депозитарием непатогенных микроорганизмов, а наш Центр (который назывался в то время Белорусский научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии) был определен национальным депозитарием патогенных микроорганизмов.

Также на международном уровне в юридическом плане работа Коллекции регулируется Картахенским протоколом по биобезопасности (Монреаль, 2000) к Конвенции о биологическом разнообразии (Рио де Жанейро, 1992). Республика Беларусь присоединилась к Картахенскому протоколу в 2002 г., принятием Закона о присоединении Республики Беларусь к Картахенскому протоколу по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии, от 6 мая 2002 г. № 97. Данная Конвенция направлена на сохранение биологического разнообразия и взаимовыгодное использование генетических ресурсов путем предоставления необходимого доступа к этим ресурсам.

Также Коллекция включена в Государственный регистр информационных ресурсов 21.11.2012 № 1761203264.

В задачи Коллекции входит:

- накопление и гарантированное сохранение вирусов и бактерий, в том числе выделенных на территории Республики Беларусь;
- хранение штаммов, подлежащих элиминации в окружающей среде;
- подбор оптимальных методов консервации и длительного хранения вирусов;
- разработка правил депонирования оригинальных штаммов вирусов, выделенных на территории республики Беларусь, референс-штаммов, штаммов-продуцентов вакцинных и лечебных препаратов, генетически измененных штаммов вирусов;
- обеспечение международного сотрудничества и обмена информацией по вопросам выполнения Будапештского договора по депонированию и поддержанию штаммов микроорганизмов;
- обеспечение контроля трансграничного перемещения патогенных микроорганизмов.

Сбор штаммов возбудителей заболеваний человека проводится с учетом их значимости, потенциальной ценности для развития теоретической инфектологии, изучения этиологии и эпидемиологии заболеваний человека. Обеспечение надлежащего сохранения штаммов патогенных микроорганизмов в Республике Беларусь — основополагающая задача Коллекции.

Кроме того, сотрудники Коллекции организуют и проводят работы по подготовке ежегодной информации в рамках Конвенции о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия (КБТО), а также участвуют в системе контроля трансграничного перемещения патогенных микроорганизмов.

Фонд коллекции включает эталонные вирусные и бактериальные культуры и оригинальные изоляты с измененными генетическими свойствами, выделенные от пациентов, из природных резервуаров на территории Республики Беларусь, странах СНГ, некоторых странах Африки, а также различные рекомбинантные плазмиды.

Коллекция включает штаммы возбудителей таких опасных заболеваний, как геморрагические лихорадки Ласса, Марбург, Эбола, прототипные штаммы Денге 1-4, Западного Нила, желтой лихорадки, штаммы выделенные на территории Республики Беларусь, резистентные варианты микроорганизмов, плазмиды. Фонд хранения постоянно пополняется и на 1 октября 2019 г. насчитывает 386 штаммов вирусов, 416 бактерий, 20 одноклеточных грибов. За 9 месяцев 2019 г. коллекционный фонд был пополнен 21 штаммом вирусов и бактерий, которые поступили из лаборатории внутрибольничных инфекций учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет и кафедры эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

На хранение принимаются штаммы, представляющие интерес для практического применения или для исследовательских целей. Информация о штаммах, находящихся на хранении, помещается в каталог, а сами штаммы выдаются из коллекции по запросам заинтересованных лиц. После проверки чистоты и жизнеспособности поступающего штамма, депозитору выдается соответствующее свидетельство о приеме культуры на депонирование (Удостоверение). Коллекция осуществляет национальное патентное депонирование в случае, если на штамм или способ с его использованием планируется подать заявку на патент Республики Беларусь.

Обеспечение контроля трансграничного перемещения патогенных микроорганизмов является одной важной функцией Коллекции по реализации международных обязательств Республики Беларусь еще двух международных договоров – Конвенции о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия (КБТО), а также резолюции 1540 (2004) Совета Безопасности ООН. На базе Центра функционирует национальный контактный пункт по КБТО, ответственный за подготовку и предоставление в ООН (через Министерство иностранных дел Республики Беларусь) докладов по мерам укрепления доверия области биологической безопасности. Центр является также одним из основных исполнителей, в части касающейся биологической сферы «Национального рамочного документа („дорожная карта“) по дополнительным мерам в отношении выполнения резолюции Совета Безопасности ООН 1540 (2004)». Оба этих международных документа предусматривают жесткий контроль со стороны государства за трансграничным перемещением биологических агентов.

Специалисты Коллекции рассматривают предоставляемые различными организациями – заказчиками заявки на трансграничное перемещение биологических агентов и, на

основании этого рассмотрения, готовят экспертное заключение для выдачи Министерством здравоохранения Республики Беларусь соответствующего разрешения на ввоз/вывоз/транзит биологических агентов через государственную границу и территорию Республики Беларусь.

Таким образом, решение различных научных и прикладных задач в области контроля инфекционных заболеваний в суверенной Беларуси невозможно в настоящее время без наличия эффективно функционирующей национальной коллекции культур патогенных микроорганизмов.

С учетом этой значимости на основании постановления Совета Министров Республики Беларусь от 14.12.2012 № 1152 «Об объявлении коллекций генетических ресурсов растений, штаммов грибов, вирусов и бактерий научными объектами, которые составляют национальное достояние» Коллекция объявлена научным объектом, который составляет национальное достояние Республики Беларусь и зарегистрирована в Государственном реестре научных объектов, составляющих национальное достояние республики под № 9.

Направления дальнейших исследований Коллекции включают оптимизацию способов длительного хранения микроорганизмов, а также пополнение коллекционного фонда штаммами микроорганизмов, патогенных для человека, выделенными во время эпидемических вспышек и представляющими серьезную проблему для здравоохранения страны, возбудителями особо опасных и социально-значимых инфекций, способных создавать чрезвычайные эпидемические ситуации.

Ключевые слова: специализированная коллекция, вирусы и бактерии, патогенные для человека, коллекционный фонд, Беларусь.

STATUS OF SPECIALIZED COLLECTION OF VIRUSES AND BACTERIA PATHOGENIC FOR HUMAN AND REPLENISHMENT OF THE COLLECTION FUND IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Semenov S.F., Petkevich A.S., Krasko A.G., Samoiloa T.I., Rodionova L.P., Shipul V.N.

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

A specialized collection of viruses and bacteria pathogenic for humans at the Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Collection) was created in 1995 to preserve and maintain strains of microorganisms isolated as a result of research carried out since 1960-s. Based on the Decree of the Council of Ministers of the Republic of Belarus dated December 14, 2012 No. 1152, the Collection was declared a scientific object constituting the national treasure of the Republic of Belarus. The collection includes strains of dangerous diseases pathogens (viral hemorrhagic fevers Lassa, Marburg, Ebola, dengue, West Nile, etc.) and strains isolated on the territory of the Republic of Belarus, resistant variants of microorganisms, plasmids. The storage fund is constantly updated and as of October 1, 2019, it includes 386 strains of viruses, 416 bacteria, and 20 unicellular fungi. The directions of further research of the Collection include optimization of the methods for long-term storage and replenishment of the collection fund by microorganisms strains pathogenic for human, isolated during epidemic outbreaks and pathogens of especially dangerous and socially significant infections that can create emergency epidemic situations.

Keywords: national specialized collection, viruses and bacteria, pathogenic for humans, collection fund, Belarus.

Поступили 02.10.2019

МОНИТОРИНГ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ИНВАЗИВНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: ИТОГИ ИССЛЕДОВАНИЙ 2016-2019 гг.

Таланкина А.С., Титов Л.П., Хархаль А.Н.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Введение. Инвазивные бактериальные заболевания (ИБЗ) являются серьёзной проблемой здравоохранения в мировом масштабе, включая и Республику Беларусь. К ним относятся менингиты, бактериемия и сепсис различной этиологии. Бактериальный менингит является наиболее значимым, поскольку представляет собой угрожающее жизни состояние, требующее быстрого распознавания и своевременного лечения [1]. Основными возбудителями являются *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* [2, 3]. При отсутствии лечения летальность может достигать 70%, а у каждого пятого выжившего могут возникать серьезные осложнения, включая тугоухость, неврологические расстройства и др. Ежегодно в Беларуси регистрируется около 200 случаев менингитов бактериальной этиологии, летальность составляет 5-10%.

В последние десятилетия в мире произошел существенный прогресс в области иммунопрофилактики менингококковой, пневмококковой и гемофильной инфекций. В результате этого заболеваемость и летальность населения в определенных странах существенно снизилась, но при этом отмечается существенное изменение генетической структуры возбудителей [4]. Эпидемиологический надзор в довакцинальный период за возбудителями ИБЗ, относящимися к категории целевых в плане вакцинации, требует постоянного и более глубокого изучения. Лабораторная служба страны играет важнейшую роль в данной системе и требует соответствия международным стандартам, включая контроль качества исследований. В Беларуси в последние 5 лет налажена система молекулярно-генетического мониторинга ИБЗ (детекция возбудителей в образцах биологического материала, идентификация чистых культур возбудителей, определение серо-, генотипов возбудителей, эпидемиологических и филогенетических связей, распространения на территории страны, основных трендов в резистентности возбудителей к антибиотикам).

Материалы и методы. Материалом для исследования явились 142 штаммов возбудителей ИБЗ (менингококк, пневмококк, гемофильная палочка) и 767 образцов биологического материала (66, 4% СМЖ и 33, 6% сыворотка или плазма крови), полученные от пациентов с подозрением на ИБЗ, направленные в период апрель 2016 г. – август 2019 г. Лечебно-профилактическими учреждениями страны в республиканскую референс – лабораторию по диагностике ИБЗ, и сопроводительная документация к ним.

Культивирование, молекулярная и бактериологическая идентификация культур микроорганизмов выполнялись в полном соответствии с практикой, описанной в руководстве 2011 г. по лабораторной диагностике менингитов Всемирной организации здравоохранения и Центров по контролю и профилактике заболеваний США [3]. Экстракция ДНК из образцов биологического материала выполнялась сорбентным методом с использованием центрифужных силика-колонок. Детекция возбудителей в ПЦР-РВ осуществлялась путем амплификации генов-мишеней, разработанных и валидированных для использования с образцами ДНК, выделенной из клинического материала (СМЖ и кровь). Для детекции и идентификации менингококка использовался ген супероксид-дисмутазы *Cu/Zn (sodC)*, пневмококка – ген аутолизина (*lytA*), кодирующий липопротеин *D* наружной мембраны [5].

Результаты и обсуждение. При исследовании полученных культур, образцов биологического материала и сопроводительной документации к ним, установлено, что за период апрель 2016 г. – август 2019 г. всего в референс-лаборатории подтверждено микробиологически 142 случаев ИБЗ. Из них, в 75 случаях (52,8%) этиологическим агентом являлся менингококк, в 42 случаях (29,6%) – пневмококк, в 25 случаях (17,6%) – гемофильная палочка.

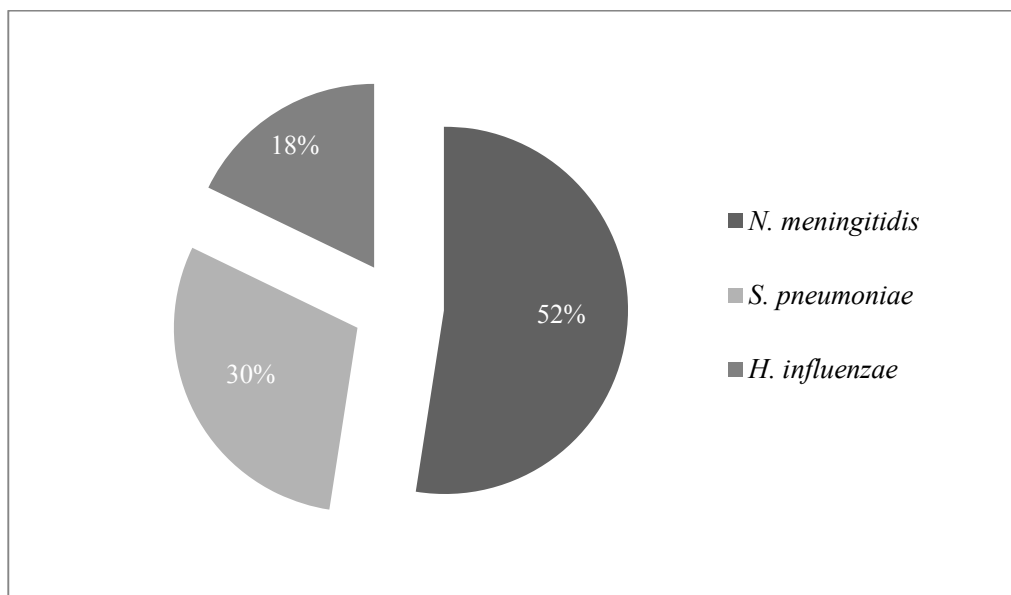


Рисунок. – Процентное соотношение основных возбудителей ИБЗ

Из 142 описанных случаев 64 случая (45,8%) приходится на детей в возрасте до 5 лет, 13 случаев (9,2%) – на детей в возрасте от 5 до 18 лет, 61 случай (43,7%) – на лиц 18 лет и старше. Полученными данными подтверждается, что возрастная группа детей до 5 лет является наиболее восприимчивой группой риска развития инвазивных бактериальных заболеваний.

Этиологическая структура лабораторно подтвержденных случаев ИБЗ значительно варьирует в зависимости от возраста пациентов. В младшей возрастной группе детей до 5 лет наиболее значимым этиологическим агентом является менингококк и обеспечивает наибольшую долю случаев – 54,7% (35/64), что статистически значимо отличается от таковых пневмококка (10/64 случаев, 15,6%) и гемофильной палочки (19/64 случаев, 29,7%). В возрастной группе детей от 5 до 18 лет ИБЗ вызываются пневмококком, пневмококком и гемофильной палочкой в количестве 7 (53,8%), 3 (23,1%) и 3 (23,1%) из 13 случаев соответственно. У возрастных пациентов достоверно чаще ИБЗ вызывает менингококк (33/61 случаев, 54,1%), чем пневмококк (26/61, 43%) и гемофильная палочка (2/61, 3,3%).

Заключение. Совершенствование эффективности системы эпидемиологического надзора за инвазивными бактериальными заболеваниями во многом зависит от внедрения в стране международного опыта его организации и использования современных (более чувствительных и специфичных) методов выявления патогенов в материале от пациентов, их идентификации, генетического типирования и оценки чувствительности к антибиотикам. Полученные в результате исследования данные говорят о том, что основным возбудителем бактериального менингококка в Беларуси является *N. meningitidis*, а самыми уязвимыми возрастными группами населения являются дети до 5 лет и взрослые от 18 лет.

Ключевые слова: инвазивным бактериальным заболеваниями, бактериальный менингит, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*.

Литература

1. Титов, Л.П. Менингококковая инфекция: современное состояние проблемы / Л.П. Титов // *Здравоохранение*. – 2010. – № 12. – С. 15-23.
2. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide / P.B. McIntyre [et al.] // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380, No. 9854. – P. 1703-1711.
3. Bahr, N.C. Methods of rapid diagnosis for the etiology of meningitis in adults / N.C. Bahr, D.R. Boulware // *Biomark. Med.* – 2014. – Vol. 8, No. 9. – P. 1085-1103. doi: 10.2217/bmm.14.67
4. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual: 2nd ed. WHO/IVB.11.09. – CDC. WHO, 2011. – 323 p.
5. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes / M. Carvalho [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, No. 5. – P. 1611-1618.

MONITORING ON PATHOGENS OF INVASIVE BACTERIAL DISEASES IN BELARUS: RESEARCH RESULTS, 2016-2019

Talankina A.S., Titov L.P., Kharkhal' A.N.

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

Invasive bacterial diseases (IBD) include meningitis, bacteremia, and sepsis of various etiologies. The main causative agents of bacterial meningitis are *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis*. The research material was 142 strains of pathogens of invasive bacterial diseases and 767 samples of biological material obtained from patients with suspected IBD, obtained between preel 2016 - August 2019. In 75 cases (52.8%), meningococcus was the etiological agent, in 42 cases (29.6%) - pneumococcus, in 25 cases (17.6%) hemophilic bacillus. The most susceptible to invasive bacterial diseases age group were children under 5 years old. Among them, the main etiological agent is meningococcus.

Keywords: invasive bacterial diseases, bacterial meningitis, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*.

Поступили 16.09.2019

СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ

¹Трусевич М.О., ¹Титов Л.П., ²Горбич Ю.Л.

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Введение. В современном мире наиболее значимой проблемой продолжает оставаться смертность от инфекционной патологии, ведущую роль в которой играют смертельные исходы, связанные с развитием септических состояний. Эпидемиологические данные показывают, что частота септических состояний в течение последнего десятилетия имеет выраженную тенденцию к росту. В первую очередь это связывают с ростом резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Частота летальности варьирует от 20-40% при сепсисе до 60-80% при септическом шоке.

На сегодняшний день остро встает вопрос раннего выявления септического состояния, так как диагностика сепсиса по наличию подтвержденной гемокультуры не всегда возможна, вследствие длительности получения по времени результата посева крови и назначения антибактериальной терапии, предшествующей забору крови. Поэтому актуальным остаются вопросы по выявлению сепсис-ассоциированных биомаркеров.

В настоящее время активно дискутируется роль взаимодействия системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов, макрофагов, дендритных клеток) и регуляторных Т-клеток при различных инфекционных состояниях, так как фагоцитарные и антиген-презентирующие способности этих клеток определяют развитие адекватного иммунного ответа на бактериальную инфекцию.

Цель работы – оценить характер изменения субпопуляционного состава моноцитов и регуляторных Т-клеток периферической крови у пациентов с бактериальным сепсисом.

Материалы и методы. Объектом исследования была кровь донорская неопробованная (ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий») и кровь от пациентов с диагнозом сепсис (УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» и УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска).

Субпопуляционный состав моноцитов и Трег-клеток периферической крови определяли методом проточной цитометрии по стандартной методике. В работе использовали следующие моноклональные антитела: CD4-FITC клон MEM-241, CD14-FITC клон MEM-15, CD16-PE клон CB16, CD25-APC клон MEM-181, CD45-APC клон HI30, HLA-DR-PE-Cy7 клон L243. Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Данные анализировали при помощи программы FACSDiva версии 7. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 10. Для сравнения двух независимых выборок применяли U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ субпопуляции моноцитов проводили по интенсивности экспрессии молекул CD14 и CD16. Расчет процентного содержания производили от числа всех CD14⁺ моноцитов крови. Регуляторные Т-клетки определяли по интенсивности экспрессии молекул CD4 и CD25. Полученные результаты представлены в таблице.

Таблица. – Субпопуляционный состав моноцитов и регуляторных Т-клеток периферической крови у пациентов с бактериальным сепсисом

	Доноры (Д) (n=10-12)	Пациенты с сепсисом (П) (n=10-12)	Уровень значимости (p) Д vs П
Моноциты			
Моноциты, общ.	6,12±0,93	3,64±1,07	0,0075
HLA-DR+	88,13±2,79	36,45±20,78	0,001
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ классические	84,00±2,33	55,59±17,83	0,0062
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ промежуточные	10,27±2,12	17,08±7,30	0,1432
CD14 ^{+/-} CD16 ⁺ неклассические	5,71±1,44	28,18±2,40	0,0404
-от числа моноцитов			
Регуляторные Т-клетки			
CD4 ⁺ клетки	42,71±4,54	41,63±11,51	0,6242
CD4 ⁺ CD25 ⁺	1,56±0,31	3,11±1,80	0,06
-от числа лимфоцитов			

В ходе работы было выявлено достоверное снижение количества моноцитов крови и уровня экспрессии на мембране клеток молекул главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR ($p < 0,05$). Снижение экспрессии HLA-DR на циркулирующих CD14⁺ моноцитах является отличительным признаком изменения иммунного статуса у пациентов с сепсисом.

При анализе субпопуляционного состава моноцитов у пациентов с бактериальным сепсисом по сравнению с контрольной группой было выявлено достоверное снижение процента классических моноцитов (CD14⁺⁺CD16⁻) и увеличение неклассических (CD14^{+/-}CD16⁺) ($p < 0,05$), в то время как в процентном содержании промежуточных моноцитов (CD14⁺⁺CD16⁺) не было выявлено достоверных различий. Также не было выявлено достоверных различий в процентном составе регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток.

Заключение. Моноциты играют центральную роль в патофизиологии бактериального сепсиса, и снижение количества CD14⁺HLA-DR⁺ моноцитов может служить маркером септического состояния.

Ключевые слова: моноциты, регуляторные Т-клетки, проточная цитометрия.

SUBPOPULATIONS OF MONOCYTES AND REGULATORY T-CELLS OF PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH BACTERIAL SEPSIS

¹Trusevich M.O., ¹Titov L.P., ²Gorbich Yu.L.

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

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Peripheral blood subpopulations of monocytes and regulatory T-cells in patients with bacterial sepsis were analyzed by flow cytometry. There was a significant decrease in the percentage of classical monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻) and an increase in non-classical (CD14^{+/-}CD16⁺) ($p < 0.05$), while there were no significant differences in the percentage of intermediate monocytes (CD14⁺⁺CD16⁺). There were also no significant differences in the percentage of regulatory T-cells.

Keywords: monocytes, regulatory T-cells, flow cytometry.

Поступили 14.10.2019

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННОЙ ВГС-ИНФЕКЦИИ В РАЗНЫЕ ВРЕМЕННЫЕ ПЕРИОДЫ

Хомбак О.А., Матиевская Н.В., Сказка А.Э.

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Республика Беларусь*

Введение. В настоящее время вирусный гепатит С (ВГС) является актуальной проблемой здравоохранения во всем мире в связи с его широкой распространенностью среди трудоспособного населения. По мнению экспертов ВОЗ, ежегодно в мире инфицируются ВГС 3-4 млн человек. Общее количество хронически инфицированных ВГС составляет 130-180 млн человек. По прогнозной оценке экспертов CDC, в мире в последующие 5 лет ожидается увеличение количества инфицированных ВГС до 400-450 млн. Ежегодно от связанных с гепатитом С болезнью печени умирает примерно 350 000 пациентов. На 2018 г. в Гродненской области состоит на диспансерном учете: ХВГС – 3 364 пациента, лица с антителами к ВГС (anti HCV) – 1 615.

Цель исследования – провести анализ клинико-эпидемиологических данных ВГС-инфицированных пациентов в зависимости от времени диагностики заболевания.

Материалы и методы. Проведен анализ клинико-эпидемиологических и лабораторных данных 200 пациентов с ВГС-инфекцией, состоящих на учёте в КДК Гродненской инфекционной больницы. В зависимости от времени диагностики ВГС-инфекции пациенты были распределены на 4 группы: 1 группа – 1990-1999 гг. (19 пациентов / 9,5%), 2 группа – 2000-2009 гг. (34 пациента / 17%), 3 группа – 2010-2015 гг. (62 пациента / 31%), 4 группа – 2016-2019 гг. (85 пациентов / 42,5%).

Результаты. Средний возраст пациентов на момент диагностики ВГС-инфекции в 1 группе был 23,7 года, во 2 группе – 34,3 года, в 3 группе – 38,7 лет, в 4 группе – 48,5 лет. Распределение пациентов в группах по полу было следующим: в 1 группе мужчины составили 68,4% (13 случаев), женщины – 31,6% (6), во 2 группе мужчины составили 61,8% (21), женщины – 38,2% (13), в 3 группе было 64,5% (40) мужчин, 35,5% (22) женщин, в 4 группе – 45,9% (39) мужчин, 54,1% (46) женщин.

При оценке факторов риска заражения ВГС на проведение различных оперативных вмешательств указывали: в 1 группе – 6 пациентов (31,6%), во 2 группе – 10 пациентов (29,4%), в 3 группе – 9 пациентов (14,5%), в 4 группе – 14 пациентов (16,5%). Переливание компонентов крови имело место в 1 группе – у 4 пациентов (21%), во 2 группе – у 4 (11,8%), в 3 группе – у 2 (3,2%), в 4 группе – у 6 (7,1%). Употребление инъекционных наркотических препаратов отметили: во 2 группе – 2 (5,9%) пациента и в 3 группе – 1 (1,6%) пациент. Не известны причины заражения ВГС были в 1 группе у 10 (52,6%) пациентов, во 2 группе – у 18 (52,9%) пациентов, в 3 группе – у 49 (79%), в 4 группе – у 66 (77,6%) пациентов.

Распределение по генотипам ВГС было следующим: в 1 группе 1 генотип был у 16 (84,2%) пациентов, 3 генотип у 3 (15,8%) пациентов, во 2 группе 1 генотип был у 18 (52,9%), 3 – у 14 (41,2%), в 3 группе 1 генотип – у 19 (30,6%) пациентов, 3 – у 43 (69,4%) пациентов, в 4 группе 1 генотип был у 30 (35,3%) пациентов, 3 – у 55 (64,7%).

Противовирусную терапию получали пациенты всех групп. Интерферонотерапия в 1 группе была у 8 (42,1%) пациентов, во 2 группе – у 11 (32,4%), в 3 – у 7 (11,3%), в 4 не проводилась. Препараты прямого противовирусного действия (ПППД) получали в 1 группе – 6 (31,6%), во 2 группе – 5 (14,7%), в 3 – 15 (24,2%), в 4 – 15 (17,7%) пациентов.

Выводы. За последние 3 десятилетия отмечено увеличение среднего возраста пациентов с впервые диагностированной ВГС-инфекцией с 23,7 до 48,5 лет, доли женщин

в структуре ВГС-инфицированных пациентов с 31,6 до 54,1%, частоты инфицирования 3 генотипом ВГС – с 15,8 до 69,4%. Отмечено увеличение доли факторов риска инфицирования ВГС неустановленной причины с 52,6% до 79%, снижение доли риска гемотрансфузий с 21% до 3,2%. Противовирусную терапию ПППД получили 24,2% пациентов в анализируемой группе, что указывает на недостаточный охват современной противовирусной терапией нуждающихся пациентов.

Ключевые слова: вирусный гепатит С, генотипы, впервые диагностированный, противовирусная терапия.

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE FIRST DIAGNOSED HCV INFECTION AT DIFFERENT TIME PERIODS

Khombak O.A., Matievskaya N.V., Tale A.E.

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Keywords: viral hepatitis C, genotypes, first diagnosed, antiviral therapy.

Поступили 30.08.2019

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПАРКИНСОНИЗМ И МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: ЭФФЕКТЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

¹Шадрина В. К., ¹Алейникова Н.Е., ²Кузнецова Т.Е., ¹Иванчик Г.И., ¹Бойко А.В.

¹Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся дегенерацией нейронов черной субстанции ствола головного мозга и сопровождающееся неврологическими и когнитивными нарушениями [1]. Среди новых терапевтических подходов к лечению БП перспективным является использование клеточной терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК), которые способны инициировать процессы нейрорепарации, обладают свойством трансдифференцировки и проявляют иммуномодулирующие эффекты [2].

Цель – оценить поведенческий и неврологический статус, морфологические и нейрохимические показатели животных с экспериментальной моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма до и после клеточной терапии ММСК.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования явились 6-месячные самки белых крыс (n=30) массой 300-350 г, у которых путем ежедневной подкожной инъекции ротенона, растворенного в липовенозе, в концентрации 2 мг/кг, моделировали экспериментальный паркинсонизм в течение 3-х недель. Аналогичный объем (500 мкл) липовеноза получала контрольная группа животных (n=10). На 15-й день ротенон-индуцированного паркинсонизма части животных вводили ММСК ранних пассажей, выделенные из моноклеарной фракции клеток красного костного мозга бедренных костей животных: интраназально в концентрации 1×10^5 /животное (n=10) и внутривенно в концентрации 1×10^6 /кг (n=10). Мониторинг животных осуществляли в течение 3 недель.

Валидность экспериментальной модели и эффекты клеточной терапии ММСК у оценивали в динамике по поведенческим тестам в установке «открытое поле» (вертикальная двигательная активность, груминг, количество болюсов дефекации, частота урикации, исследование отверстий, неактивное время), неврологическому статусу (олигокинезия, постуральная нестабильность, неустойчивость походки, тремор и мышечная ригидность), патоморфологическим исследованиям (морфометрическое определение тяжести и степени поражения головного мозга) и по определению концентрации нейрохимических показателей (α -синуклеин, дофамин, гомованилиновая кислота (ГВК)) методом иммуноферментного анализа в сыворотке и спинномозговой жидкости у животных с экспериментальным паркинсонизмом. Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 8.0.

Результаты и их обсуждение. У крыс с экспериментальным паркинсонизмом на 7-й день после введения ротенона наблюдались статистически значимые изменения поведенческих реакций, сопровождающиеся нарушением спонтанной двигательной активности, эмоциональной лабильностью в совокупности с увеличением неактивного времени, изменением частоты груминга, нарушением ориентировочно-исследовательских реакций, мышечной ригидностью и вегетативной симптоматикой по сравнению с контрольной группой животных ($p < 0,05$). Неврологический статус экспериментальных животных характеризовался значимым нарастанием олигокинезии (8 баллов на 4-е сутки), постуральной нестабильности (7 баллов на 4-е сутки), неустойчивости походки (3 балла к 9-м суткам), тремора (2 балла к 14-м суткам) при отсутствии неврологической симптоматики у животных контрольной группы ($p < 0,05$). Клиническая симптоматика паркинсонизма сопровождалась морфологическими изменениями нейронов черной субстанции среднего мозга с образованием телец Леви в единичных нейронах. У крыс с экспериментальным паркинсонизмом установлено увеличение концентрации α -синуклеина в спинномозговой жидкости и сыворотке (223 (193÷414) пг/мл и 313 (185÷332) пг/мл, $p < 0,05$ соответственно) и снижение соотношения дофамина к ГВК относительно контрольной группы.

Введение ММСК лабораторным крысам с экспериментальным паркинсонизмом приводило к улучшению локомоторной активности (увеличение груминга и вертикальной двигательной активности, начиная с 4-х суток ($p < 0,05$), наряду со снижением неактивного времени), повышению количества ориентировочно-исследовательских реакций, увеличению показателя мышечной ригидности на 1 см ($p < 0,05$) и стабилизации неврологического статуса животных к 7-14-м суткам после клеточной терапии. Клинико-неврологический эффект клеточной терапии сохранялся в течение всего периода наблюдения и достигал показателей уровня контрольной группы к 35-м суткам после лечения.

При морфометрической оценке выявлена тенденцию к снижению тяжести и степени повреждения ткани головного мозга (67,3% и 79,1% – при интраназальном введении ММСК соответственно), а также уменьшение количества выявляемых телец Леви в раннем посттрансплантационном периоде (7-14 сутки).

Как при системном, так и при локальном введении ММСК установлено статистически значимое снижение на 32% концентрации α -синуклеина в спинномозговой жидкости экспериментальных животных. Показано, что интраназальное введение ММСК крысам с экспериментальной моделью паркинсонизма вызывает нарастание концентрации ГВК в сыворотке животных к 14-м суткам с последующим снижением к 21-м суткам, предположительно в результате истощения метаболизма дофамина в сохранившихся дофамин-продуцирующих нейронах. Соотношение дофамина к ГВК увеличивалось в 2,3 раза в группе животных с экспериментальным паркинсонизмом, получавшим клеточную терапию ММСК.

Выводы. Введение ММСК лабораторным крысам с ротенон-индуцированным паркинсонизмом приводило к улучшению локомоторной активности, ориентировочно-исследовательских реакций, стабилизации неврологического статуса животных на фоне снижения тяжести и степени повреждения ткани головного мозга, а также инициации нейрорепаративных процессов, что может быть использовано для разработки нового терапевтического подхода лечения БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, ротенон, экспериментальная модель, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

Литература

1. Awareness and current knowledge of Parkinson disease: a neurodegenerative disorder / A.U. Khan [et al.] // Int. J. Neurosci. – 2019. – Vol. 129, No. 1. – P. 55-93. doi: 10.1080/00207454.2018.1486837
2. Therapy with mesenchymal stem cells in Parkinson disease: history and perspectives / D. Mendes Filho [et al.] // Neurologist. 2018. – Vol. 23, No. 4. – P. 141-147.

EXPERIMENTAL PARKINSONISM AND MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS: EFFECTS OF CELL THERAPY

¹Shadrina V., ¹Aleinikava N., ²Kuznetsova T., ¹Ivanchik G., ¹Boika A.

¹*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

In this abstract, the effect of MMSC-based therapy in laboratory rats with an experimental model of Parkinsonism was characterized.

Keywords: Parkinson's disease, rotenone, experimental model, multipotent mesenchymal stromal cells.

Поступили 25.09.2019

Сборник научных трудов
«СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ
ЧЕЛОВЕКА»

Правила для авторов

1. Статьи должны быть написаны на высоком научном и методическом уровне с учетом требований международных номенклатур, отражать актуальные проблемы инфекционной патологии человека, содержать новую научную информацию, рекомендации практического характера.

2. Статья должна быть напечатана на одной стороне листа с одинарным межстрочным интервалом в 1-м экземпляре. Для всего текста публикации использовать шрифт Times New Roman размером 12 пунктов, абзацный отступ (красная строка) 1 см, с выравниванием по ширине, межстрочный интервал одинарный, без установки автоматического переноса, все поля по 25 мм.

3. Объем статьи, включая рисунки, таблицы, библиографический список литературы 5-7 страниц формата А4, научных обзоров – до 12 страниц.

4. Статья должна быть изложена на русском или английском языке для иностранных авторов.

5. Заглавие статьи печатается с выравнивание 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 жирным шрифтом;**

3) *название учреждения, город, страна – указываются на следующей строке курсивом нежирным шрифтом.*

6. После заглавия (на языке текста публикуемого материала) приводится резюме. Текст резюме должен содержать краткую информацию (до 10 строк) о результатах публикуемой работы, отражать, что нового несет в себе работа в сравнении с другими известными по тематике публикациями. После резюме 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 исследования и обсуждение, заключение или выводы; библиографический список (литература). В разделе «материалы и методы исследований» 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. Пояснительные данные помещают под фотографией, графиком, рисунком, схемой, а со следующей строки – слово "Рисунок", номер и наименование иллюстрации, отделенного от номера точкой и знаком тире. Точку в конце нумерации и наименований иллюстраций не ставят. Слово «Рисунок», его номер и наименование иллюстрации, печатаются полужирным шрифтом. Не допускается перенос слов в наименовании рисунка. 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, 2]).

12. После «библиографического списка» печатается название статьи, фамилии авторов, название учреждения с указанием города и страны, резюме (100-150 слов) и ключевые слова на английском языке (если статья англоязычная, резюме 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, тел.: (+375-172)630439/376979, факс: (+375-172)673093,
E-mail: rrpcem@belriem.by или belriem@gmail.com <http://www.belriem.by/>

СОДЕРЖАНИЕ

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ В СИСТЕМЕ ДИАГНОСТИКИ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО СЛЕЖЕНИЯ ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Горбунов В.А., Дронина А.М., Носова Е.С., Вишинская А.С., Петкевич А.С., Карабан И.А., Филонюк В.А., Жукова Н.П.</i>	3
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ	16
Обзорные сообщения	16
ЭПИДСИТУАЦИЯ ПО ЗАПАДНО-НИЛЬСКОЙ ИНФЕКЦИИ И ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Самойлова Т.И., Петкевич А.С., Красько А.Г., Аблова Т.А., Горбунов В.А.</i>	16
Оригинальные исследования	23
АЛГОРИТМ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РАССЛЕДОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КИШЕЧНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ <i>Амвросьева Т.В., Бозуш З.Ф., Шилова Ю.А., Лозюк С.К., Казинец О.Н., Поклонская Н.В., Кишкурно Е.П.</i>	23
ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ <i>Дронина А.М., Гузовская Т.С., Самойлович Е.О.</i>	31
НАДЗОР ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА У ДЕТЕЙ ДО 15 ЛЕТ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2017 И 2018 ГГ. <i>Ермолович М.А., Ухова И.Ф., Свирчевская Е.Ю., Семейко Г.В., Самойлович Е.О.</i>	35
АНАЛИЗ ДИСПАНСЕРНОГО УЧЕТА КОНТИНГЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ ПОД НАБЛЮДЕНИЕМ ФТИЗИАТРОВ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Климук Д.А., Гуревич Г.Л., Скрягина Е.М., Калечиц О.М., Белько А.Ф., Бобрукевич Е.Л., Тышко М.А., Данькова А.В., Ильясова Е.В.</i>	40
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЭХИНОКОККОЗУ НА ТЕРРИТОРИИ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Корзан А.И., Чирцова С.В., Тарелко А.К., Ильяшева Е.В., Садовникова Г.В.</i>	47
НОРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА, МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, НОВЫЕ ГЕНОТИПЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ <i>Поклонская Н.В., Лозюк С.К., Амвросьева Т.В., Глинская И.Н., Голотик Д.М., Федорова Е.М.</i>	54
ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ НАСЕЛЕНИЯ г. МИНСКА <i>Приложинская Е.А., Хомченко Е.А., Бабуркина О.С., Гулик Г.Н., Радкевич С.В.</i>	61

СТРУКТУРА СТАЦИОНАРНЫХ ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ В 2018 ГОДУ <i>Саварина В.А., Мицура В.М., Малаева Е.Г., Терешков Д.В., Поддубный А.А.</i>	64
КОРЬ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2018 Г. <i>Самойлович Е.О., Семейко Г.В., Высоцкая В.С., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Глинская И.Н.</i>	68
КРАСНУХА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2016-2019 ГГ. <i>Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю.</i>	74
КИШЕЧНЫЕ ПАРАЗИТАРНЫЕ ИНВАЗИИ в УКРАИНЕ <i>Шагинян В.Р., Данько О.П., Сопиль А.В., Дьяченко О.П., Николаенко С.Н.</i>	78
МИКРОБИОЛОГИЯ	84
<i>Оригинальные исследования</i>	84
ОДНОВРЕМЕННАЯ БЫСТРАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ НА НЕРЕСПИРАТОРНЫХ ОБРАЗЦАХ И ТКАНЕВОМ МАТЕРИАЛЕ <i>Дюсьмикеева М.И., Скрягина Е.М., Яцкевич Н.В., Журкин Д.М., Михайлова О.В.</i>	84
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОФИТИЙ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ СРЕДСТВАМ, АНТИСЕПТИКАМ И ДЕЗИНФЕКТАНТАМ <i>Звягинцева К.Б., Буткевич В.В., Циркунова Ж.Ф., Дронина А.М., Максимова Н.П.</i>	88
СЕРОТИПОВОЙ ПЕЙЗАЖ ШТАММОВ НАЗОФАРИНГЕАЛЬНЫХ ПНЕВМОКОККОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН <i>Исаева Г.Ш., Баязитова Л.Т., Тюрин Ю.А.</i>	92
ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПИЧЕСКОГО ПЕЙЗАЖА ИЗОЛЯТОВ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ У ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА МИНСКА <i>Капустина Ю.М., Рубаник Л.В., Сухобокова Н.Н., Коваленко Е.В., Полещук Н.Н.</i>	95
КОКЛЮШ: ПРИЧИНЫ РОСТА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ <i>Колодкина В.Л., Мартынов В.С.</i>	99
НОВЫЕ СХЕМЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ШИРОКО ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Скрягина Е.М., Солодовникова В.В., Климук Д.А., Ветушко Д.А., Якубеня О.Н., Журкин Д.М., Михайлова О.В., Дюсьмикеева М.И.</i>	103
ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛИСТИНА В ОТНОШЕНИИ КОЛИСТИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> АНТИБИОТИКАМИ РАЗНЫХ ГРУПП <i>Тапальский Д.В., Петровская Т.А.</i>	107

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ФАСЦИОЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА <i>Щемелева Н.Ю., Дударчук А.Н.</i>	113
АССОЦИАЦИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ 23S РРНК <i>HELICOBACTER PYLORI</i> , СВЯЗАННЫХ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К КЛАРИТРОМИЦИНУ, С ЧАСТОТОЙ ГЕНОВ ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ <i>Янович О.О., Дорошко М.В., Титов Л.П.</i>	117
ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ <i>Ярец Ю.И., Шевченко Н.И.</i>	123
ВИРУСОЛОГИЯ	130
<i>Обзорные сообщения</i>	130
СТРАТЕГИИ ИЗЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ: ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ И ТРУДНОСТИ ИХ РЕАЛИЗАЦИИ <i>Бобкова М.Р.</i>	130
<i>Оригинальные исследования</i>	136
ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ДЕТЕЙ <i>Амвросьева Т.В., Аринович А.С., Кишкурно Е.П., Поклонская Н.В., Богущ З.Ф., Шилова Ю.А., Бельская И.В., Лозюк С.К., Минаковская Н.В., Марейко Ю.Е.</i>	136
БЛЯШЕЧНЫЕ МУТАНТЫ ВИРУСОВ В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ <i>Бореко Е.И., Павлова Н.И., Владыко Г.В.</i>	141
МАЗИ ТРИТЕРПЕНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭФФЕКТИВНЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЖНОМ ГЕРПЕСЕ БЕЛЫХ МЫШЕЙ <i>Бореко Е.И., Савинова О.В.</i>	150
ДИНАМИКА ИЗОЛЯЦИИ ПОЛИОВИРУСОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ СХЕМЫ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Ермолович М.А., Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Ухова И.Ф., Семейко Г.В.</i>	155
ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВИТАМИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ПРОГРАММНОМ ГЕМОДИАЛИЗЕ <i>Карпов И.А., Козаченко М.Г.</i>	159
ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ БОРРЕЛИЯМИ, ФЛАВИВИРУСАМИ И РИККЕТСИЯМИ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ <i>Князева О.Р., Погоцкая Ю.В., Красько А.Г., Полещук Н.Н.</i>	166

ИЗУЧЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ <i>Самойлова Т.И., Красько А.Г., Яшкова С.Е., Шипуль В.Н., Залевская О.С., Климович О.В., Цвирко Л.С., Дракина С.А.</i>	171
ИНФИЦИРОВАННОСТЬ КРОВОСОСУЩИХ КОМАРОВ ВИРУСОМ ЗАПАДНОГО НИЛА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ БЕЛАРУСИ <i>Самойлова Т.И., Яшкова С.Е., Залевская О.С., Шипуль В.Н., Климович О.В., Цвирко Л.С.</i>	174
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РОТАВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОДНОРАУНДОВОЙ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ <i>Семейко Г.В., Полякова Н.В., Ермолович М.А., Самойлович Е.О.</i>	179
ИММУНОЛОГИЯ	184
<i>Оригинальные исследования</i>	184
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ ШТАММА ВНУКОВО-32, ПРИМЕНЯЕМОГО ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ АНТИРАБИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ ОЧИЩЕННОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СУХОЙ <i>Антонова Л.П., Каа К.В., Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Мосолова С.В., Игнатъев Г.М.</i>	184
ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ АСТРОЦИТОВ ИЗ ГИППОКАМПАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И ИХ НАНОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ <i>Асташинок А.Н., Квачева З.Б., Филатова ЕА, Гузов С.А., Полещук Н.Н.</i>	191
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ Fe ₃ O ₄ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ <i>Поддубнов С.В., Орёл Н.М., Счеслёнок Е.П., Семижон П.А.</i>	196
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ <i>Рябцева Т.В., Макаревич Д.А., Кирковский В.В., Голубович В.П.</i>	202
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ Тезисы республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии», 30-31 октября 2019 г.	206
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА <i>Адамович А.Ю., Дыбов О.Г., Старостин А.М., Игнатович Т.В.</i>	206
РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ <i>NEISSERIA GONORRHOEAЕ, 2017-2018 гг.</i> <i>Анискевич А.В., Шиманская И.Г., Голубовская Т.Н., Станиславова И.Н., Суслов В.С., Унемо М.</i>	208

КАТЕТЕР-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИНФЕКЦИИ: ЭФФЕКТИВНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ <i>Боронина Л.Г.</i>	209
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДНК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЖЕЛУДКА У ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ <i>HELICOBACTER PYLORI</i> <i>Воропаев Е.В., Баранов О.Ю., Осипкина О.В., Зятков А.А., Шафорост А.С., Платошкин Э.Н.</i>	211
КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХГВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ <i>Грибок И.А.</i>	213
АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И АНТИФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ БАЗИДИАЛЬНЫХ КСИЛОТРОФНЫХ ГРИБОВ <i>Дегтярёва Е.И., Коваленко С.А., Рубаник Т.Ф.</i>	215
ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ХВГС-ВИЧ КО-ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ ПОЛУЧАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С ПРЕПАРАТАМИ ПРЯМОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ <i>Ерёмин С.В., Карпов И.А.</i>	218
УРОВЕНЬ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА КАК ПРЕДИКТОР НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ: РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ <i>Захарова А.Г., Доценко Э.А.</i>	220
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АРОБОВИРУСОВ ОТ КОМАРОВ РАЗНЫХ ВИДОВ <i>Игнатъев Г.М., Антонова Л.П., Каа К.В., Жиренкина Е.А., Самарцева Т.В., Оксанич А.С.</i>	222
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕНИЯ ЯИЦ ГЕЛЬМИНТОВ И ЦИСТ ПРОСТЕЙШИХ С ПОМОЩЬЮ ГРАНУЛИРОВАННОЙ И МИКРОПЛАЗМЕННОЙ ФОРМ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ <i>Карамышева Ю.С., Комаров А.И., Гудков В.Г., Орда Д.В., Искандарова Д.О.</i>	223
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> С ГИПЕРМУКОИДНЫМ ФЕНОТИПОМ <i>Козлова А.И., Тапальский Д.В.</i>	226
ДИНАМИКА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ УРОЛОГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА <i>Лагун Л.В., Акушевич С.А., Мишукова Ю.Д.</i>	229
ЧАСТОТА И СТРУКТУРА НЕЙРОИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ В ИНФЕКЦИОННЫЙ СТАЦИОНАР <i>Матиевская Н.В., Совквич А.Л., Ланец М.П.</i>	231
ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНФЕКЦИИ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ВУЛЬГАРНЫМИ И РОЗОВЫМИ УГРЯМИ, ПЕРИОРАЛЬНЫМ ДЕРМАТИТОМ И ОПТИМИЗАЦИЯ ИХ ТЕРАПИИ <i>Навроцкий А.Л., Раммахи Лейф Мохаммед Рида Ясеен</i>	233

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГРИБКОВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ <i>Новикова Т.П., Доценко Э.А.</i>	235
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ <i>Пархомчук О.Ю., Зверко В.В., Григорьева Е.Е., Фомина Е.Г.</i>	237
ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОЯВЛЕНИЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА КОКЛЮША В УСЛОВИЯХ ВНЕДРЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ <i>Раевская И.А., Шилова М.А., Потакова Л.М.</i>	239
СОСТОЯНИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ, ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ПОПОЛНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ <i>Семенов С.Ф., Самойлова Т.И., Красько А.Г., Петкевич А.С., Родионова Л.П., Шипуль В.Н.</i>	241
МОНИТОРИНГ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ИНВАЗИВНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: ИТОГИ ИССЛЕДОВАНИЙ 2016-2019 ГГ. <i>Таланкина А.С., Титов Л.П., Хархаль А.Н.</i>	244
СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ <i>Трусевич М.О., Титов Л.П., Горбич Ю.Л.</i>	247
КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЕРВЫЕ ДИАГНОСТИРОВАННОЙ ВГС-ИНФЕКЦИИ В РАЗНЫЕ ВРЕМЕННЫЕ ПЕРИОДЫ <i>Хомбак О.А., Матиевская Н.В., Сказка А.Э.</i>	249
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПАРКИНСОНИЗМ И МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: ЭФФЕКТЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ <i>Шадрина В.К., Алейникова Н.Е., Кузнецова Т.Е., Иванчик Г.И., Бойко А.В.</i>	250
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	253

Научное издание

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Основан в 2008 году

Выпуск 12

Главный редактор:
канд. мед. наук, доц. *В.А. Горбунов*

Ответственный редактор:
д-р мед. наук, проф. *А.С. Владыко*

Редакторы:
Е.С. Носова, Т.А. Аблова

Компьютерная верстка:
Т.А. Аблова, А.А. Ничипорук

Подписано в печать 23.10.2019.
Формат 60x84/8. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 30,22. Тираж 60. Заказ 1128.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Государственное предприятие «СтройМедиаПроект».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий:
№ 1/43 от 03.10.2013, № 2/42 от 13.02.2014.
Ул. В. Хоружей, 13/61, 220123, г. Минск.