**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**
**РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

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

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

**Сборник научных трудов**

**выпуск 6**

Минск
2013

УДК 616.9(066)(045)
ББК Р.25.2.0.1
С 56

*Сборник нучных трудов*
*Основан в 2008 г.*

Редакционная коллегия:
*В.А. Горбунов (Беларусь), О.Е. Иванова (Российская Федерация), А.В. Мокиенко ( Украина),*
*Г.Г. Мелик-Андреасян (Армения), Э.И. Коренберг (Российская Федерация), И.К. Спыну (Молдова), Н.Н. Митрофанова (Российская Федерация),*
*С.А. Крамарев (Украина), Н.А. Виноград (Украина), Л.М. ДуБуски (США)*

Рецензенты:
канд. мед. наук, доц. *А.С. Петкевич*; д-р мед. наук, проф. *Т.В. Амвросьева*;
д-р мед. наук, доц. *Е.И. Бореко*; канд. мед. наук, доц. *В.Г. Гудков*; канд. мед. наук, доц. *А.Г. Красько*;
д-р мед. наук, доц. *В.Ф. Еремин*; д-р мед. наук, проф. *Н.Н. Полещук*;
д-р мед. наук, доц. *Е.О. Самойлович*; канд. биолог. наук *Т.С. Ермакова*;
канд. мед. наук *В.Л. Колодкина*; канд. мед. наук *М.А. Ермолович*

Под редакцией
чл.-корр. НАН Беларуси, д-ра мед. наук, проф. *Л.П. Титова*

**Современные проблемы инфекционной патологии человека:** сб. науч. тр. Вып. 6 / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Электрон. текстовые дан. — Минск: ГУ РНМБ, 2013. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

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-генетичеких 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.

**УДК 616.9(066)(045)**
**ББК Р.25.2.0.1**

**ISSN 2310-0990**

© Составление. ГУ РНПЦЭМ, 2013.
© Оформление. ГУ «Республиканская научная медицинская библиотека», 2013.

# ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ПО БОРЬБЕ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Горбунов В.А., Мельникова Е.И., Петкевич А.С., Шмелева Н.П.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

Инфекционные заболевания по-прежнему остаются одной из серьезнейших проблем здравоохранения, возрастает их роль в общей заболеваемости населения. Благодаря успехам медицинской науки выявлена инфекционная природа целого ряда соматических заболеваний (сердечно-сосудистые, онкологические, аутоиммунные, аллергические, неврологические и другие). Возникновение новых видов инфекций, возвращение хорошо известных, но измененных в результате мутаций возбудителей, высокие темпы приобретения возбудителями устойчивости к лекарственным и дезинфицирующим препаратам — вот далеко не полный перечень проблем, требующих неотложного решения.

Резкое обострение терроризма в мире и связанное с этим возрастание угрозы биотеррористической деятельности определяют необходимость укрепления уровня биобезопасности государств, защиты населения и территории нашей страны от инфекционных заболеваний.

Все это происходит на фоне глобализации экономики и связанного с ней роста масштабов и скорости миграции населения, увеличения его плотности и обострения проблем природного характера, что многократно повышает риск возникновения эпидемий и пандемий. В современных условиях оправдана необходимость решения широкого круга задач, связанных с разработкой высокочувствительных, быстрых, сравнительно недорогих методов обнаружения и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, разработкой эффективных средств профилактики и лечения инфекционных заболеваний, основанных на последних достижениях науки и техники. На современном этапе развития общества существует необходимость опережающего развития научных исследований в области гигиены, эпидемиологии, бактериологии, вирусологии, паразитологии и иммунологии на основе молекулярно-биологических, генно-инженерных и биотехнологических подходов в сочетании с должным лабораторным подтверждением, а также повышение эффективности научной деятельности и решение конкретных задач практического здравоохранения.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (далее — Центр) определяет идеологию борьбы с массовыми и опасными инфекциями на территории Беларуси. Он создан в 1924 г. на базе Минской Пастеровской Станции и Центральной химико-бактериологической лаборатории губернского отдела здравоохранения. На протяжении всей своей истории основной задачей Центра была и остается борьба с наиболее актуальными и социально значимыми для нашей страны инфекционными заболеваниями.

На сегодняшний день Центр является ведущим научным учреждением Министерства здравоохранения Республики Беларусь в области контроля инфекционных заболеваний, выполняющим широкий спектр научно-прикладных задач в области эпидемиологии, вирусологии, микробиологии, иммунологии и медицинской биотехнологии.

Основной задачей Центра является поддержание санитарно-эпидемиологического благополучия страны, санитарной охраны ее населения и территории от основных инфекционных и паразитарных заболеваний.

Для реализации данной задачи Центр работает по следующим основным направлениям:

- развитие фундаментальных и прикладных исследований, прежде всего в области нанотехнологий, как основы решения научных и прикладных задач, так и для поддержания и развития приоритетных научных направлений в области вирусологии, бактериологии и иммунологии, а также в области этиологии, патогенеза, диагностики, иммунопрофилактики и иммунокоррекции актуальных инфекционных и иммунных болезней;
- координация усилий ученых страны и специалистов практического здравоохранения по эффективному внедрению результатов научных исследований и отечественных разработок и технологий в практику здравоохранения;
- разработка и экспериментальное производство иммунобиологических препаратов. Создание изделий медицинского назначения и технологических процессов, необходимых для их применения в практическом здравоохранении, других отраслях народного хозяйства, а также с целью обеспечения необходимого импортозамещения и валютосбережения;

- разработка и внедрение в практику здравоохранения новых технологий (биотехнологических процессов генной инженерии) в области создания и производства диагностических, профилактических и лечебных препаратов с целью удовлетворения потребностей в них практических учреждений республики;

- развитие системы оказания платных медицинских услуг населению и учреждениям здравоохранения в области диагностики актуальных инфекционных и паразитарных заболеваний;

- проведение и совершенствование системы контроля качества противомикробных и иммунобиологических препаратов;

- подготовка научных кадров высшей квалификации и повышение квалификации специалистов практического звена.

- международное сотрудничество.

Все поставленные перед Центром задачи реализуются в рамках практически всех существующих в стране форм организации научных исследований: государственных (ГП), государственных научно-технических (ГНТП), отраслевых (ОНТП), межгосударственных целевых программ (МЦП), Белорусского фонда фундаментальных исследований и др.

Центр участвует также в выполнении Государственных программ, направленных на обеспечение биологической, демографической безопасности страны, повышение рейтинга человеческого потенциала: Государственная программа социально-экономического развития Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Государственная программа инновационного развития Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Национальная программа развития экспорта Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Государственная программа развития рейтинга человеческого потенциала Республики Беларусь 2011–2015 гг.; Программа развития санитарно-эпидемиологического нормирования в Республике Беларусь 2011–2012 гг. и др.

С 2011 г. сформирована новая ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» (2011–2015 гг.) (далее Программа), головной организацией-исполнителем которой является Центр.

Целью Программы является развитие отечественной инновационной нанотехнологии для разработки и внедрения в практическое здравоохранение эффективных средств специфической профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекционных и иммунных заболеваний; повышение эффективности эпидемиологического надзора за инфекциями; обеспечение потребности лечебно-профилактических учреждений в диагностических препаратах.

В соответствии с поставленной целью Программы определены ее задачи: разработка и внедрение молекулярно-генетических методов в систему мониторинга актуальных для Республики Беларусь инфекций (ОРВИ и грипп, кишечные инфекции, гепатиты, ВИЧ, туберкулез и др.); создание современных отечественных технологий производства новых поколений диагностических, лечебно-профилактических и других иммунобиологических препаратов; разработка и внедрение в практику здравоохранения страны новых средств и методов профилактики и лечения ряда инфекционных и иммунных заболеваний.

В рамках данной Программы выполняется 45 заданий. Научные исследования в рамках Программы выполняются в следующих направлениях: система эпиднадзора за распространенными инфекционными заболеваниями (9 заданий); средства для диагностики вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний с использованием новых перспективных биотехнологий (20 заданий); средства профилактики и лечения вирусных, бактериальных, иммунных заболеваний (10 заданий); разработка эффективных средств контроля природно-очаговых, карантинных и особо опасных инфекционных заболеваний (5 заданий); научно-организационное сопровождение программы (1 задание).

В целом в настоящее время Центр выполняет 60 заданий НИР в рамках 14 научных и научно-технических программ.

Для успешного осуществления данной деятельности Центр располагает всеми необходимыми возможностями – квалифицированным персоналом, современными технологиями, высокотехнологичным медицинским оборудованием.

В центре работают высококвалифицированные специалисты, из них: 15 докторов наук, 35 кандидатов наук, член-корреспондент НАН Беларуси, 1 заслуженный деятель науки.

Центр имеет современную научно-исследовательскую и материально-техническую базу (новый уникальный лабораторный корпус, соответствующий максимальному классу биологической

безопасности (P3-P4) и международным стандартам GLP и GMP), оснащен современным медицинским и лабораторным оборудованием. Это позволяет осуществлять комплексные научные исследования, обеспечивать качественное выполнение научных исследований и разработок, готовить научных работников высшей квалификации. Материально-техническая база лабораторий Центра ежегодно обновляется и пополняется.

Центр осуществляет активное международное сотрудничество.

На базе Центра успешно функционирует ряд национальных референс-центров и референс-лабораторий:

- Национальный центр по гриппу и другим острым респираторным заболеваниям;
- Национальный референс-центр по полиомиелиту;
- Региональная референс-лаборатория по ротавирусам ЕРБ ВОЗ (для Армении, Азербайджана, Грузии, Республики Молдовы, Таджикистана, Украины);
- Республиканская референс-лаборатория по кори и краснухе;
- Республинаский референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов;
- Республиканская референс-лаборатория по диагностике инвазивных бактериальных заболеваний;
- Республиканская референц-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С.

Референс-лаборатории осуществляют научно-методическое руководство выполнения на территории Беларуси программ эпидемиологического надзора за соответствующими инфекциями, являются национальными корреспондентами ВОЗ, работают в тесном сотрудничестве с региональным центрами ВОЗ (обмен информацией, биологическими материалами, стажировки аспирантов, подготовка совместных документов и т. д.). В своей деятельности национальные референс-центры подотчетны Министерству здравоохранения Республики Беларусь и Европейскому региональному бюро (ЕРБ) ВОЗ и предоставляют в установленном порядке отчеты о результатах проведенных исследований, обзоры по эпидситуации, заключения о выполнении программ эпидемиологического надзора в республике и др.

Референс-лаборатории координируют деятельность медицинских учреждений по реализации взятых на себя Республикой Беларусь международных обязательств в рамках соответствующих глобальных и региональных программ.

Центр участвует также в международных научных программах: Межгосударственной целевой программе Евразийского экономического сообщества (ЕврАзЭС) «Инновационные биотехнологии» на 2011–2015 гг.; в программе Союзного государства «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток» (шифр «Стволовые клетки», раздел программы 4.1.2 и 5.2) на 2011–2013 гг..

Центр участвует в выполнении других международных обязательств нашей страны — принял активное участие в подготовке национального рамочного документа («дорожной карты») по дополнительным мерам в отношении выполнения резолюции Совета Безопасности ООН 1540. Центр решением Министерства здравоохранения Республики Беларусь определен также национальным контактным пунктом, ответственным за подготовку и предоставление докладов по мерам укрепления доверия в рамках Конвенции о запрещении производства, хранения бактериологического (биологического) и токсинного оружия и об их уничтожении (КБТО). Эта и другая деятельность направлена на развитие межгосударственного сотрудничества стран-участников ООН в вопросах укрепления международной безопасности в мире.

Обязательным элементом в цепи последовательных работ по разработке средств индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний является сохранение и пополнение коллекции штаммов микроорганизмов. Коллекционный фонд важен при решении практических задач разработки и изготовления иммунологических и диагностических препаратов на основе имеющихся в коллекции производственных штаммов актуальных вирусных и бактериальных инфекций для обеспечения лабораторий практического здравоохранения Республики Беларусь. Вирусные и бактериальные штаммы стали неотъемлемой частью биотехнологии, используются для решения медико-биологических проблем, вирусологии, иммунологии, инфекционной патологии.

Для обеспечения охраны уникальности имеющегося вирусного и бактерийного материала на базе Центра создана и успешно развивается Специализированная коллекция вирусов и бактерий, патогенных для человека, в которой хранятся и поддерживаются в жизнеспособном состоянии уникальные штаммы, изоляты и культуры, выделенные от пациентов, из природных резервуаров на территории Республики Беларусь, странах СНГ, некоторых странах Африки. Сегодня коллекция включает также штаммы и оригинальные изоляты, штаммы с измененными генетическими свойствами и рекомбинантные плазмиды, эталонные вирусные и бактериальные культуры.

Постановлением Совета Министров Республики Беларусь «Об объявлении коллекций генетических ресурсов растений, штаммов грибов, вирусов и бактерий научными объектами, которые составляют национальное достояние» от 14.12.2012 № 1152 Специализированная коллекция вирусов и бактерий, патогенных для человека, зарегистрирована в Государственном реестре научных объектов, которые составляют национальное достояние, под № 9.

Особое внимание в центре уделяется развитию инновационной деятельности.

В соответствии с планами освоения и внедрения научно-технической продукции и поручениями Министерства здравоохранения Республики Беларусь обеспечиваются потребности лечебно-профилактических учреждений республики в отечественных диагностических препаратах в среднем до 70%, а по некоторым позициям до 100% и соответственно обеспечивается импортозамещение зарубежных аналогов.

Продукция, разработанная в центре, востребована лечебно-профилактическими, санитарно-эпидемиологическими и другими учреждениями Республики Беларусь. Ряд инновационных разработок центра уникальны, имеют мировую новизну, производятся только в нашей стране и находят спрос в других странах.

Разработанная в центре диагностическая продукция экспонируется на различных Международных выставках.

Наиболее востребованной диагностической продукцией в настоящее время являются тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита С, гепатита А, антигенов рота-, энтеровирусов, наборы для сбора и кон-центрирования вирусов из вод различного вида пользования, тест-системы для диагностики ОРВИ и гриппа, природно-очаговых инфекций (Лайм-боррелиоз, КЭ, ЗН, лептоспироз), наборы для обнаружения возбудителей кишечных паразитарных болезней, наборы для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов, культуры клеток (FL, MDSK, RPMI-1640), питательные и ростовые среды и др.

Центр отвечает за контроль качества поступающих в республику вакцинных и других иммунобиологических лекарственных средств: проводится посерийная проверка качества зарегистрированных в Республике Беларусь иммунобиологических лекарственных средств (ИЛС) до поступления на реализацию (Постановление МЗ РБ № 20 от 01.03.2010), а также испытания вакцин и других ИЛС при их регистрации на территории страны.

Результаты испытаний ИЛС постоянно вводятся в единую компьютерную программу базы данных по проверке качества иммунобиологических лекарственных средств для контроля и анализа рынка иммунобиологических лекарственных средств в стране.

Потенциал Центра позволяет осуществлять комплексные научные исследования по направлениям научно-технической и инновационной деятельности, обеспечивать качественное выполнение научных исследований и разработок, а так же оказывать платные медицинские услуги населению и учреждениям республики, в рамках которых проводится диагностика актуальных инфекционных заболеваний. Платные медицинские услуги проводятся высококвалифицированными специалистами в аккредитованных лабораториях на современном оборудовании.

Центр уделяет постоянное внимание подготовке кадров — высококвалифицированных специалистов (имеется аспирантура, докторантура и спецсовет по защите диссертаций), практических работников (на рабочих местах, рабочих семинарах, «Днях специалистов», республиканских и международных конференциях), молодых специалистов — студентов (практические занятия и производственная практика), дипломников и школьников («День открытых дверей») и других формах .

Центр использует общественные рычаги — на базе центра функционирует «Медицинское общественное объединение эпидемиологов, микробиологов и паразитологов», Центр также активно сотрудничает с «Медицинским общественным объединением иммунологов».

Постоянным направлением деятельности центра является работа с населением и со СМИ.

Таким образом, центр располагает всеми необходимым для реализации основной задачи своей деятельности — обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия Республики Беларусь, санитарная защита ее населения, территории и поддержание тем самым требуемого уровня биологической безопасности государства, как составного элемента национальной безопасности.

## ACTIVITIES OF THE REPUBLICAN RESEARCH & PRACTICAL CENTER FOR EPIDEMIOLOGY AND MICROBIOLOGY TO COMBAT AGAINST DISEASES IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**Gorbunov V.A., Melnikova E.I., Petkevich A.S., Shmeleva N.P.**

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

The article contains an overview of the activities of the Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology (RRPCEM) which today is a present-day and advanced National R&D Center, where a wide range of fundamental studies and of applied investigations in the area of epidemiology, medical virology, microbiology, immunology and parasitology are conducted. Main R&D trends and activities: improvement of the national system of infectious diseases surveillance, development of immuno- and molecular biologic diagnostic preparations against the agents of main infections, elaboration and implementation into medical practice of up-to-date diagnostic, medical, and vaccine preparations, quality controls of immunobiological products and training of specialists at the courses in the field.

**Keywords:** epidemiology, virology, microbiology, immunology, parasitology.

Поступила 02.09.2013

# ОСОБЕННОСТИ ФАУНЫ КЛЕЩЕВЫХ ПАТОГЕНОВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В ПАРКАХ МЕГАПОЛЮСОВ И ФАКТОРЫ ИХ ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ

**Алексеев А.Н., Дубинина Е.В.**

*Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Рассмотрены существующие объективные причины в виде глобального потепления климата и постоянного загрязнение среды, ведущие к постепенному увеличению доли иксодовых клещей-переносчиков в фауне зеленых зон мегаполисов. Этот процесс сопровождается доминированием одних видов клещевых патогенов среди других. В урбанизированных очагах трансмиссивных инфекций преобладает трудно диагностируемая безэритемная форма клещевого боррелиоза с возбудителем *Borrelia garinii*. Обращено внимание на опасность этого процесса для населения России: сочетание нейроборрелии *B. garinii* с возбудителем другой нейроинфекции — вирусом клещевого энцефалита (КЭ) — значительно утяжеляет заболевание. Обсуждается роль птиц в формировании очагов трансмиссивных инфекций в городах.

**Ключевые слова:** иксодовые клещи-переносчики, клещевые патогены, *Borrelia garinii*, изменения климата, техногенное загрязнение среды.

**Введение.** Все большая часть населения планеты стекается в города, которые обеспечивают более комфортабельные условия существования и занятость, т. к. вблизи них сосредоточены многие предприятия и производства. Однако проживание в городах не ограждает жителей от заболеваний природно-очаговыми инфекция. На территории городов (особенно больших) происходит формирование урбаноценозов. Необратимый и объективный процесс урбанизации в XX в. — мощный экологический фактор. Он – результат особенностей современного общественного строя и научно-технического прогресса. Растущие города и их пригороды постепенно включают территории, сохранившие характер природных ландшафтов, превращая их в городские, где идут процессы синантропизации многих видов животных, в т. ч. переносчиков. Урбанизация приводит к уменьшению численности и видового разнообразия многих диких животных, росту чила дичающих домашних животных. Таким образом, создается новое «городское сообщество» — урбаноценоз, которое нарушает все прежние законы отношений между живыми организмами, населяющими данную территорию, и человеком.

Кроме того, для современного градостроения характерно включение в состав сплошной застройки остатков поселков сельского типа, создание городских парков и зеленых «оазисов» внутри обширных «дворов». Таким образом, в черте города и в ближайших окрестностях создается тепловое «пятно», где температура воздуха на 5–7°C выше окружающей [1]. Причиной этого является уменьшение испарения воды на застроенных урбанизированных территориях, система отопления построек и обилие двигателей внутреннего сгорания, которые являются и источниками тепла, и поступления в окружающую среду ионов тяжелых металлов.

Таким образом, рост риска заболеваний человека зоонозными инфекциями в современных условиях обусловливается рядом факторов, и большинство из них являются полностью рукотворными.

**Цель:** выявление особенностей паразитоценоза иксодовых клещей-переносчиков (*Acarina, Ixodidae*) в больших городах и связанного с этим риска заболевания городского населения клещевыми трансмиссивными инфекциями.

**Материалы и методы.** Авторами проведены многолетние исследования клещей рода *Ixodes* (таежного — *Ixodes persulcatus* и лесного — *Ixodes ricinus*) на северо-западе России. Для сравнения были исследованы популяции этих же видов на территории урбаноценозов Молдовы, Белоруссии, Литвы, некоторых регионов России. Также использованы литературные данные по этой проблеме ряда европейских стран [2–4].

Внешнюю морфологию клещей исследовали с помощью стереоскопического и частично сканирующего электронного микроскопов. Содержание в клещах и во внешней среде различных поллютантов (прежде всего ионов тяжелых металлов — Ca, Pb, Zn, Cu) определяли методом сравнительной инверсионной вольтамперометрии [5].

Для идентификации возбудителей клещевых инфекций были использованы специфические для каждой группы патогенов методики: вируса КЭ — по цитопатическому эффекту на культуре клеток СПЭВ, по присутствию антигена вируса КЭ и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР); боррелий и других бактериальных возбудителей и простейших — ПЦР с видоспецифическими праймерами, сиквенирование, RLB (Reverse Line Blotting), а для количественной оценки концентрации боррелий — ПЦР реального времени (Real-Time PCR).

Была создана электронная база данных для математической обработки материала и использована программы STATISTICA for Windows для автоматизированной обработки статистических параметров [6].

**Результаты и их обсуждение.** Заселение городов клещами переносчиками трансмиссивных инфекций происходит постоянно. В литературе описана масса случаев обнаружения клещей на территории парков внутри городов. Совместно с литовскими коллегами в 2 городских парках г. Вильнюса было собрано и исследовано 36 взрослых особей *Ixodes ricinus* [4]. Около 30% особей оказались зараженными какой-либо клещевой инфекцией, а 7 из них (19,4%) являлись носителями боррелий *B. garinii* и *B. afzelii*.

В Кишиневе в парковой зоне города в том же виде клещей идентифицированы *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. lusitaniae* и *Anaplasma phagocytophilum*. Обнаружены случаи двойных инфекций [3].

Набор клещевых патогенов для обоих видов клещей рода *Ixodes* одинаков: 3–5 видов патогенных для человека рода *Borrelia* (*B. afzelii, B. garinii, B. burgdorferi s.s., B. lusitaniae* и *B. valaisiana*), возбудители моноцитарного (*Ehrlichia muris*) и гранулоцитарного (*A. phagocytophilum*) эрлихиозов, простейшие — пироплазмиды *Babesia microti* и *Babesia divergens*.

В отличие от природных очаги, вновь образуемые на урбанизированных территориях, имеют иной характер. Отмечено, например, что в них преобладают безэритемные формы боррелиоза, вызываемые наиболее опасным возбудителем *Borrelia garinii* (в силу его нейротропности и поздней диагностики из-за отсутствия внешних проявлений).

В Красноярске в 2006–2007 гг. у 73,5%, заболевших после присасывания *I. persulcatus*, боррелиоз проявлялся без эритем [7]. Сотрудники Новосибирской СЭС считают, что для заражения боррелиозом в урбаноценозах Сибири характерно именно отсутствие эритем, а наблюдаемый рост числа безэритемных форм означает, что в городских клещах продолжает преобладать возбудитель нейроборрелиоза — *B. garinii*.

Исследования в других точках России доказали, что данная особенность проявления боррелиоза наблюдается в большинстве крупных поселениях городского типа. В С.-Петербурге в 2009 г. наши сборы 75 взрослых особей *I. persulcatus* показали, что 17 (22,6%) из них были заражены *B. garinii* (иногда в сочетании с *B. lusitaniae*) и только 8 (10,6%) — *B. afzelii*, также в некоторых случаях с *B. lusitaniae*. Из 71 особи, собранных в 2009 г. в парке г. Череповца, 11 содержали именно *B. garinii* (15,5%) и лишь 1 — *B. afzelii* (1,4%). Исследование 80 таежных взрослых клещей, отловленных в июне 2008 г. в поселке городского типа Борок Ярославской области (Институт биологии внутренних вод РАН), были обнаружены 2 особи, инфицированные одновременно 4 видами боррелий, 6 особей (7,5%) имели *B. garinii* в различных сочетаниях, включая *B. lusitaniae*, и только 3 (3,75%) — *B. afzelii*.

Возбудитель нейроборрелиоза (*B. garinii*) особенно опасен для России, т. к. он может сочетаться (и сочетается) с возбудителем другой нейроинфекции — вирусом клещевого энцефалита, течение которого существенно утяжеляется под влиянием действия этого агента. Часто выявляемая в последние годы в *I. persulcatus* северо-западного региона *B. lusitaniae* также имеет отношение к нервной ткани. Поэтому ее обнаружение только в смеси с другими видами боррелий, и особенно с *B. garinii*, еще больше увеличивает опасность наблюдаемых изменений в составе клещевых инфекций в урбаноценозах. Сочетание *B. garinii* и *B. lusitaniae* встречено в 62% случаев в окрестностях С.-Петербурга, в 75% — в поселке Борок.

Остается непонятным, почему из 5 встречающихся патогенных для человека видов боррелий именно вид *B. garinii* преобладает в иксодовых клещах мегаполисов?

Важнейшим лимитирующим фактором, определяющим существование многих паразитарных систем, является температура, и не столько среднегодовая, сколько зимняя, позволяющая бóльшей

части популяции переносчиков выживать, а возбудителям паразитарных инфекций сохраняться в них. В настоящее время происходит расширение ареалов многих переносчиков, промежуточных хозяев и самих возбудителей паразитарных болезней в более высокие широты, что обусловлено потеплением климата. Многие редкие инвазии переходят в разряд обычных, и с ними все чаще сталкиваются врачи [1].

Исследование двигательной активности клещей, зараженных различными видами патогенов, выявило значение температуры внешней среды на трех уровнях (воздух, поверхность почвы, подстила) и градиента между ними. Клещи, зараженные *B. garinii*, активируются при более высокой температуре воздуха, нежели *B. afzelii* (12,6° против 11,7°C), и при большем значении разницы температур между поверхностью почвы и более глубокими ее слоями. Для *B. garinii* этот показатель равен 1,35°, для *B. afzelii* — 0,9. *Borrelia garinii* выходит на первое место по сравнению с другим не менее распространенным видом *B. afzelii* (чаще всего дающим эритемную форму проявления боррелиоза). *Borrelia garinii* лучше сохраняется в клещах при более высоких температурах поверхности субстрата в зимнее время, что наблюдается именно в городах, где температура среды выше на 1–2,5°C, чем в пригородах. Следовательно, более теплые климатические условия города («тепловые острова» — урбаноценозы) способствуют выживанию в зимних условиях, процветанию и активизации клещей, зараженных возбудителем нейроборрелиоза, который начинает превалировать в городах среди других клещевых патогенов.

Более того, сравнение средней скорости движения (т. е. активность наползания на человека) незараженных клещей и зараженных разными видами патогенов свидетельствует о большей активности особей, зараженных именно возбудителями нейроинфекций. Использованная нами методика изучения двигательной активности клещей *I. persulcatus* с помощью оригинального прибора «клещедрома» позволяет вычислить индексы их активности [6]. Полученные значения индексов активности можно выстроить в следующий ряд: индекс незараженных клещей — 20,3 см/мин, зараженных *B. afzelii* — 22,0, зараженных *B. garinii* — 22,3, клещей со смешанной инфекцией *B. afzelii* и *B. garinii* — 24,6, клещей, зараженных 2 нейроинфекциями (вирусом КЭ и *B. garinii*), — 27,5. Таким образом, присутствие возбудителей вообще и возбудителей нейроинфекций, аффинных не только к ЦНС человека, но и к нервной системе клещей, увеличивает двигательную (поисковую) активность таежных клещей, а следовательно делает их особенно опасными [8].

Глобальное потепление климата ведет к тому, что ареалы клещей и переносимых ими инфекций изменяются. Одним из важных следствий потепления климата является большая продолжительность периода активности клещей в течение сезона и следовательно большая продолжительность эпидемического сезона. С увеличением среднегодовых температур на севере ареала таежного клеща (например, на севере Ленинградской области) теперь наблюдают 2 пика активности имаго [9]. Второй (осенний) пик связан с удлинением теплого периода года, в результате чего напитавшиеся нимфы успевают завершить метаморфоз в текущем году.

Клещевые инфекции стали теперь обязательным компонентом заболеваний горожан. Это связано с расширением контактов населения с природой (увеличение числа владельцев садовых и огородных участков и т. д.), с удлинением периода активности иксодовых клещей и с проникновением и укоренением популяций клещей в городах. В современном мире более трех четвертей населения проживает в городах, при росте которых в них включаются фрагменты прежних сельских поселений, а вместе с ними те или иные остатки внегородской флоры и фауны. Смешанный тип застройки, особенно на окраине растущих вширь городов, создает опасность и увеличивает риск попадания кровососущих членистоногих вместе с синантропными грызунами непосредственно в помещения первых этажей домов городского типа. Лишенные привычных прокормителей, кровососы могут подниматься по коммуникациям в квартиры. В Минске в зеленой зоне города, из которой могли мигрировать инфестированные клещами черные крысы, находили клещей, зараженных вирусом КЭ и боррелиями [10]. По так называемым «зеленым коридорам» (пятна растительности садов, парков и внутридворовых зеленых оазисов) и с перелетными птицами клещи, резервуары инфекций, проникают в города, где для них достаточно прокормителей (грызуны, одичавшие домашние животные) [4, 6].

Так, в Таганроге, где ведутся многолетние наблюдения, первое обнаружение лесных клещей на территории города было отмечено в 1998 г. Через 4 года были встречены присосавшиеся к людям клещи в черте города, а через 10 лет в них уже находили боррелий.

Особое значение имеют, конечно, пролетные птицы. Они являются транспортерами питающихся на них клещей, роль которых в транспортировке клещевых патогенов (боррелий, возбудителей эрлихиозов, вируса КЭ и даже риккетсий) неоднократно доказана. Многие города (Санкт-Петербург в их числе) находятся на путях пролета перелетных птиц, которые часто сами являются резервуарами патогенов. Отсутствие в городах ландшафтов с полностью земляным покрытием не останавливает залетных птиц, находящих вполне пригодные для жизни условия в парках и садах. Они приносят на себе частично или полностью напитавшихся личинок и нимф клещей, некоторые из которых заражены возбудителями инфекций. Именно там, во время питания птиц на земле, эти клещи с них отпадают. На этих небольших площадях может происходить интенсивная смена хозяев клещей: птиц на грызунов или одичавших домашних животных. Особенную тревогу вызывает рост встречаемости *B. garinii* совместно с патогенами, вызывающими эрлихиоз, риккетсиоз и, возможно, бартонеллез. Так, в мегаполисах создаются условия для формирования новых очагов смешанных клещевых инфекций: происходит обмен возбудителями, таких как клещевые боррелиозы, эрлихиозы и различные варианты вирусных инфекций (в т. ч. клещевого энцефалита). Опасность последних вызывает особенное беспокойство, поскольку чаще всего именно они являются причиной вспышек чисто человеческих инфекций при видимом отсутствии других источников заражения и сравнительно нетяжелое их течение часто диагностируют как «простуда» или ОРВИ.

Современные методы индикации позволяют определять с кровью какого прокормителя получены возбудители клещевых инфекций. Например, в Кишиневе у взрослых клещей, отловленных в черте города, в остатках крови, полученной ими на фазе личинки и нимфы, в половине случаев преобладала именно кровь перелетных птиц, и только в остальных — кровь мелких синантропных грызунов, кошек, реже — собак [3].

**Выводы.** Рост риска заболеваний человека зоонозными инфекциями в современных условиях обусловливается несколькими факторами, большинство из которых являются полностью руко-творными. Человек и его воздействие на окружающую среду — один из наиболее значимых факторов, приводящих к ее изменениям. Постоянно приспосабливаясь к условиям окружающей среды, человек меняет ее, создавая себе «комфортные» условия. В результате достижений научно-технического прогресса всплывают и негативные последствия. Постоянный рост промышленности и урбанизации территорий приводит к возрастающей антропогенной нагрузке на лесные массивы — места обитания клещей переносчиков болезней.

Таким образом, основными факторами, определяющими состав фауны возбудителей природно-очаговых инфекций в иксодовых клещах мегаполисов и риск заболевания ими, можно считать:

1) глобальное потепление климата, сжигание все большего количества топлива и использование двигателей внутреннего сгорания, удлинение сезона активности переносчиков клещевых инфекций, смещение границ распространения возбудителей «южных инфекций» на север;

2) загрязнение окружающей среды и накопление в ней ионов тяжелых металлов, изменяющих состав популяций переносчиков возбудителей клещевых инфекций, расширение спектра инфекционных агентов, переносимых клещами;

3) формирование урбаноценозов, активно идущий процесс синантропизации переносчиков, рост численности дичающих домашних животных и завоз в города все большего количества экзотических животных, что увеличивает риска заражения людей зоонозными инфекциями и способствует поддержанию очагов трансмиссивных инфекций, в сохранении которых на территории городов активно участвуют пролетные птицы;

4) возрастающая роль перелетных птиц в распространении зараженных переносчиков и возбудителей зоонозных инфекций в городах (например, вирусов птичьего гриппа или лихорадки Западного Нила);

5) растущий обмен возбудителями между популяциями человека и дикими и домашними животными, превращающий «чисто человеческих» возбудителей (например, туберкулеза) в зооантропонозные инфекции.

**Литература**

1. Todhunter, P.E. Environmental indices for the Twin Cities Metropolitan Area (Minnesota, USA) urban heat island – 1989 / P.E. Todhunter // Climate Res. — 1966. — Vol. 6. — P. 59–69.

2. Randolph, S.E. Evidence that climate change has caused ‘emergence’ of tick-borne diseases in Europe? / S.E. Randolph // VII Intern. Potsdam Symp. on tick-borne diseases. Berlin (Germany), 13—14 March 2003: Progr. and Abstr. – Berlin, 2003. – P. 13.

3. Мовилэ, А. Генетическое разнообразие иксодовых клещей *Ixodes ricinus* (L.) и трансмиссивных микроорганизмом в очагах Республики Молдова: автореф. дис. … д-ра биол. наук / А. Мовилэ. — Кишинэу, 2008. – 26 с.

4. Evidence for a risk of tick-borne infection in the city parks of Vilnius, Lithuania / M. Žygutienė [et al.] // Ekologija (Vilnius). — 2008. — Vol. 54, № 1. — P. 40–43.

5. Dubinina, H.V. New *Ixodes* tick populations appearing as a result of, and tolerant to, cadmium contamination / H.V. Dubinina, A.N. Alekseev, E.S. Svetashova // Acarina (Moscow). — 2004. — Vol. 12, № 2. — P. 141–149.

6. Алексеев, А.Н. Функционирование паразитарной системы «клещ—возбудители» в условиях усиливающегося антропогенного пресса / А.Н. Алексеев, Е.В. Дубинина, О.В. Юшкова. — СПб.: ЗОА «Инсанта», 2008. – 147 с.

7. Особенности ассоциированного течения боррелиозной инфекции и клещевого энцефалита в Красноярском крае / Н.С. Миноранская [и др.] // Материалы Рос. науч.-практич. конф. «Инфекционные болезни: современные проблемы диагностики и лечения». – СПб., 2008. — С. 148–149.

8. Алексеев, А.Н. Техногенное загрязнение, урбанизация и рост риска заболеваний трансмиссивными инфекциями / А.Н. Алексеев, Е.В. Дубинина // Вестн. ВМА. — 2009. — № 2. — С. 184–191.

9. Лобзин, Ю.В. Изменение климата как один из факторов, определяющих расширение спектра паразитарных болезней в России / Ю.В. Лобзин, С.С. Козлов // Вестн. Рос. ВМА. — 2008. —Приложение 2, ч. 1. — № 3 (23). — С. 23–24.

10. Иксодовые клещи, переносчики болезней человека, могут появляться в жилых помещениях / А.Н. Алексеев [и др.] // РЭТ-инфо. — 2005. — № 2. — С. 57–58.

## TICK-BORNE PATHOGENS OF IXODID TICKS IN URBAN PARKS: FAUNA, TRENDS AND DRIVING FACTORS

**Alekseev A.N., Dubinina E.V.**

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

Global climate warming and constant environmental pollution are considered as driving factors of the gradually increasing role of ixodid ticks, vectors of different diseases, in the fauna of green areas of megacities. This process is accompanied by the dominance of some tick-borne pathogens over the others. The commonest tick-borne disease in urban transmission foci is non-erythema borreliosis caused by *Borrelia garinii*. This disease, which is difficult to diagnose, is especially hazardous for the population of Russia as the combination of *B. garinii* with tick-borne encephalitis virus severely aggravates its progress. The role of birds in the formation of urban transmission foci is discussed.

**Keywords:** ixodid ticks, tick-borne pathogens, *Borrelia garinii*, climate changes, technogenic pollution.

Поступила 02.09.2013

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Амвросьева Т.В.[1], Зуева В.Л.[2], Поклонская Н.В.[1], Богуш З.Ф.[1], Дедюля К.Л.[1]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»;*

*[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье проанализирована сложившаяся в настоящее время ситуация по проблеме энтеровирусных инфекций (ЭВИ) человека неполиомиелитной природы в мире и на территории Беларуси. Подробно изложены клинико-эпидемиологические особенности развития эпидпроцесса в нашей стране. Представлена динамика заболеваемости за истекшее десятилетие. Описана структура зарегистрированных в последние годы ЭВИ в разрезе административных территорий, клинических форм, возрастных групп, влияния сезонных факторов. Особое внимание уделено характеристике вспышечной заболеваемости с описанием ее доминирующих возбудителей. Указываются актуальные направления совершенствования эпиднадзора за ЭВИ в Республике Беларусь.

**Ключевые слова:** энтеровирусные инфекции, энтеровирусный менингит, заболеваемость, клинические формы, возрастной состав, вспышки, энтеровирусы, эпидемиологический надзор.

Энтеровирусные инфекции неполиомиелитной природы рассматриваются сегодня как «вновь возникающие инфекционные болезни», что обуславливает их особую актуальность в мире. В по-

следние годы эта многочисленная и разнообразная по своим клиническим проявлениям группа инфекционных болезней все чаще напоминает о себе наметившейся тенденцией к активизации эпидемического процесса с развитием тяжелых клинических форм (менингитов, менингоэнцефалитов, кардитов и др.), которые чаще всего возникают в условиях вспышечной заболеваемости. Вспышки ЭВИ с определенной периодичностью регистрируются практически во всех странах [1–11], независимо от уровня их экономического развития, состояния экологии и санитарии (таблица 1). Республика Беларусь не является исключением. За последние два десятилетия вспышки ЭВИ произошли во всех административных областях [12–14]. Наиболее крупной по своим масштабам и последствиям была Минская вспышка (2003 г.), во время которой на фоне относительно легких клинических форм регистрировались менингиты, кардиты, гепатиты [14].

«Неуправляемость» ЭВИ неполиомиелитной природы (в отношении их отсутствуют вакцины) и постоянно существующий риск обострений эпидситуации обосновывают необходимость проведения регулярного эпидемиологического надзора за данной группой инфекций. Как известно, в его основе лежит систематический учет заболеваемости. Такой учет организован в нашей стране с 2003 г. Государственный статистический учет и отчетность согласно утвержденной форме «Справка о движении инфекционных заболеваний» введен с 2008 г. Он проводится по 5 нозологическим формам: энтеровирусный энцефалит, энтеровирусный менингит, энтеровирусный гастроэнтерит, энтеровирусный везикулярный фарингит, прочие формы ЭВИ (коды по X МКБ: A 85.0, A 87.0, A 08.3, B 08.5, A 88.0 соответственно).

Таблица — Вспышки ЭВИ в мире за последние 6 лет (2008–2013 гг.)

| Год | Страна | Тип ЭВ | Клиническая форма ЭВИ |
|---|---|---|---|
| 2008 | Панама | ECHO 30 | Менингит |
| 2009 | Китай | Coxsackie B 5 | Менингит |
| 2010 | Канада | Coxsackie A 9 | Менингит |
| | Египет | Coxsackie A 24 | Геморрагический конъюнктивит |
| | Китай | Coxsackie A 24 | Геморрагический конъюнктивит |
| | Индия | Coxsackie A 24 | Геморрагический конъюнктивит |
| 2011 | Китай<br>Камбоджа | Энтеровирус 71 | hand, foot and mouth disease (HFMD) |
| 2011–2012 | США | Coxsackie A 6 | Коксакивирусная экзантема |
| 2001–2012 | Тайланд | Coxsackie A 6 | HFMD |
| | Китай | ECHO 30<br>(водного происхождения) | Менингит<br>Менингоэнцефалит |
| 2013 | Россия (Ростов-на-Дону, Нижний Новгород) | Энтеровирус 71 | Менингит |
| | Россия (Москва) | ECHO 30 | Менингит |

Согласно данным статистического учета в РБ ежегодно регистрируется в среднем от 0,6 до 2,0 тыс. случаев ЭВИ. В истекшем 2012 г. интенсивность эпидемического процесса значительно возросла (в 1,6 раза). Всего ЭВИ заболело 1364 человека (2011 г. — 847 человек), показатель заболеваемости составил 14,14 на 100 тыс. населения (рисунок 1) с наиболее высоким его уровнем в г. Минске, где он был в 2,6 раза выше республиканского. Аналогичная тенденция роста заболеваемости по данным первого полугодия имеет место и в текущем 2013 г.

Наибольшая активность ЭВИ проявлялась в летне-осенний период, максимальные показатели регистрировались с августа по ноябрь. Активное действие сезонных факторов выявлялось начиная с апреля и непрерывно возрастало, достигая максимума в сентябре.

Традиционно заболеваемость ЭВИ в разрезе административных территорий республики характеризуется значительным «разбросом» показателей. Наиболее высокий уровень, как и при других вирусных ОКИ, регистрируется в г. Минске, где по данным 2012 г. показатель в 2,6 раза выше республиканского.

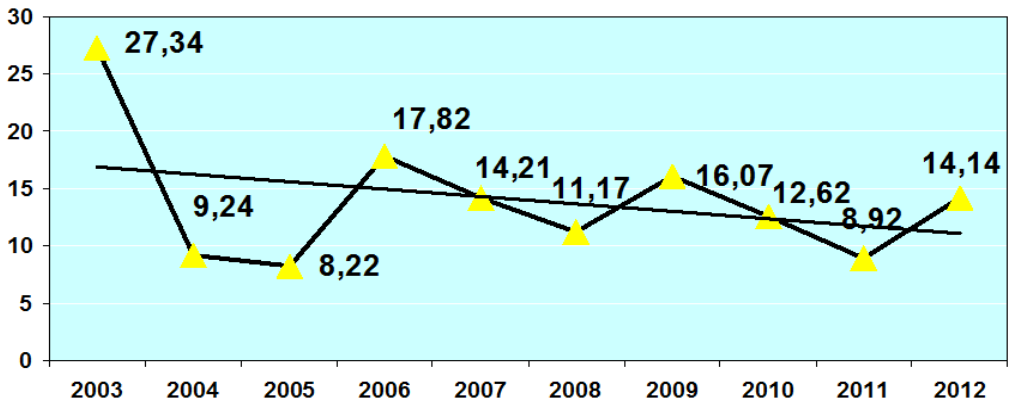



Рисунок 1 — Показатели заболеваемости ЭВИ за 2003–2012 гг.

Территориями со средним уровнем распространения ЭВИ были Брестская, Минская, Гомельская и Гродненская области, с низким — Витебская и Могилевская области (рисунок 2).

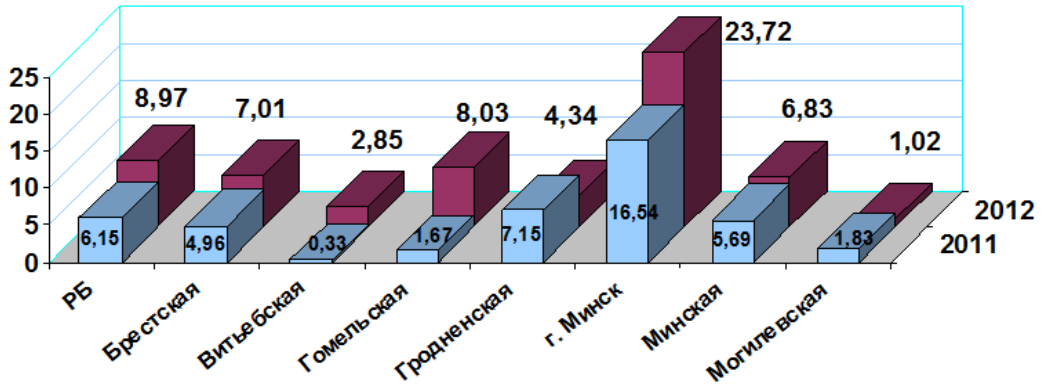



Рисунок 2 — Сравнительная заболеваемость ЭВИ в разрезе территорий и РБ за 2011–2012 гг. (на 100 тыс.)

Такой же разброс показателей имел место и в первом полугодии текущего 2013 г. (рисунок 3) .

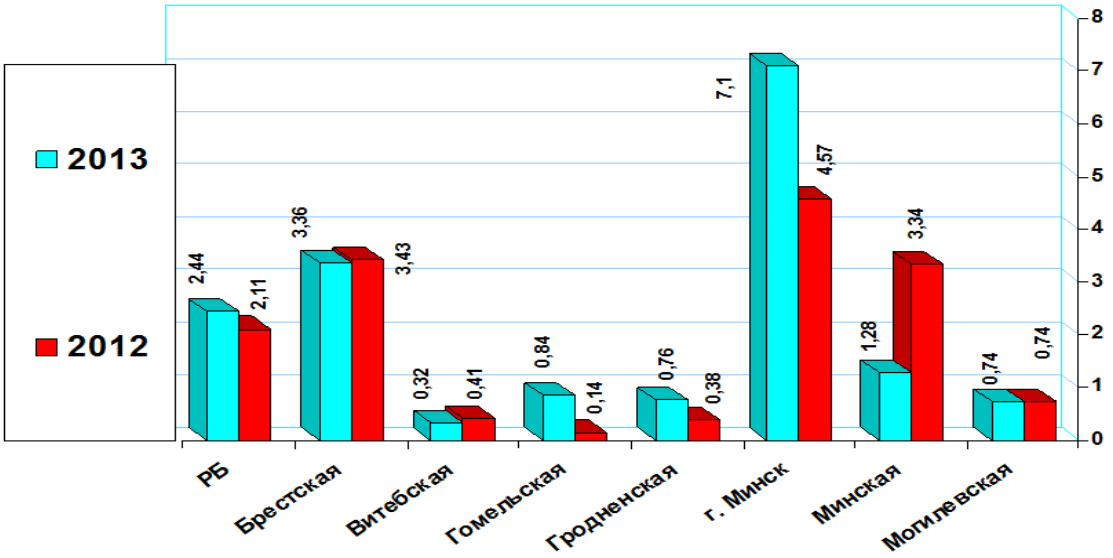



Рисунок 3 — Сравнительная заболеваемость ЭВИ в разрезе территорий и РБ за 6 мес. 2013 г. (на 100 тыс.)

В возрастной структуре регистрируемых клинических форм ЭВИ в 2012 г. преобладало детское население — до 90% заболевших. При этом более 80% заболевших составляли дети до 14 лет. Наиболее высокий удельный вес ЭВИ отмечается у детей ясельного и садового возраста (рисунок 4).

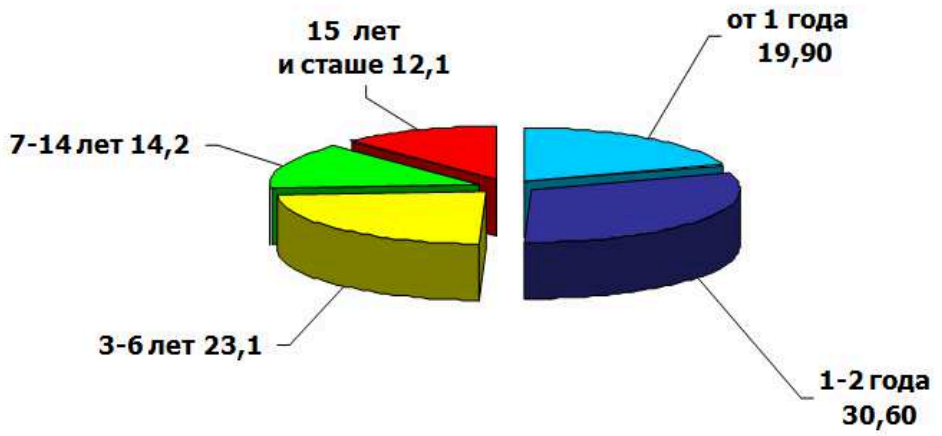



Рисунок 4 — Возрастная структура детской заболеваемости ЭВИ В РБ в 2012 г. (%)

Основной пласт заболеваемости ЭВИ во всех возрастных группах (около 90%) формировали сезонные факторы, наибольшее влияние они оказывали в эпидемически неблагополучные 2009 и 2012 гг. У детей до 2 лет влияние сезонных факторов выражено и в благополучные годы, что по мнению специалистов, может быть связано с проэпидемичеванием более старших возрастных групп в предшествующий период (рисунок 5).

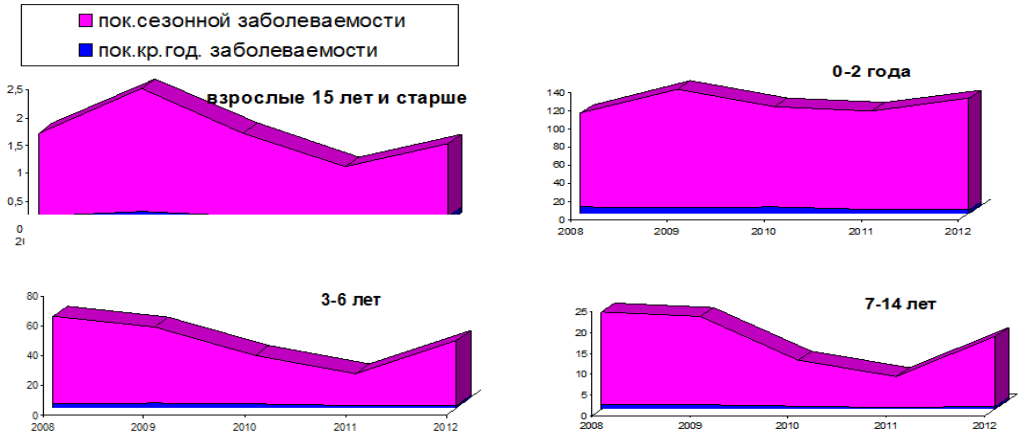



Рисунок 5 — Круглогодичная и сезонная заболеваемость ЭВИ в динамике за 2008–2012 гг. в разрезе возрастных групп

В 2012 г. по сравнению с предыдущим годом в группе детского населения (до 17 лет) показатель заболеваемости ЭВИ увеличился на 44,7% (с 29,64 до 42,91). Рост отмечался в разрезе всех детских групп, в т. ч. среди детей. У заболевшіх младшей возрастной группы (до 2-х лет) доминировали клинически более легкие формы — ЭВ гастроэнтериты, фарингиты, прочие ЭВИ (рисунок 6). У детей садового младшего школьного возраста інцидентность неврологических форм была выше, чем в других возрастных группах. У взрослых незначительно превалировали ЭВ гастроэнтериты.

В структуре клинических форм ЭВИ за последние четыре года наблюдения (рисунок 7) доминировали ЭВ гастроэнтериты (39–53%) и ЭВ фарингиты (27–35%). Изменение клинической структуры в 2012 г. характеризовалось возрастанием удельного веса ЭВ менингитов (на 7,7%), что является тревожным сигналом для прогноза эпидситуации по ЭВИ в целом.

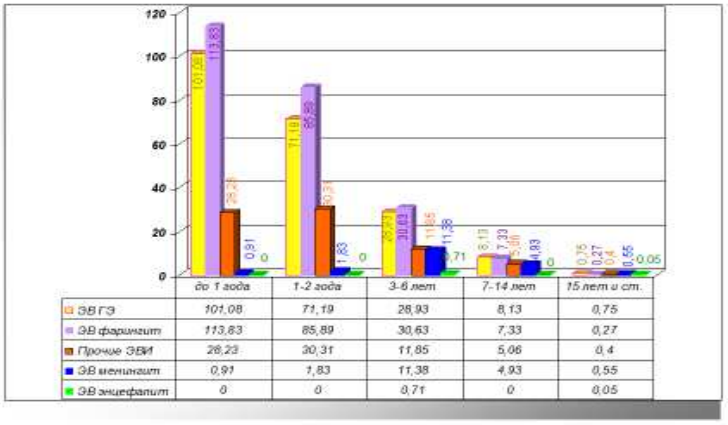



Рисунок 6 — Заболеваемость в разрезе нозологических форм ЭВИ по возрастным группам за 2012 г. (на 100 тыс. возрастной группы)

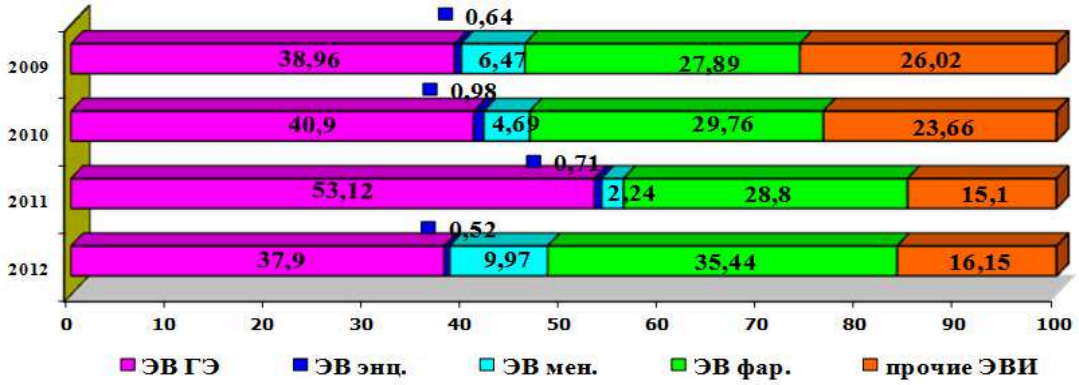



Рисунок 7 — Динамика изменения структуры клинических форм ЭВИ за 2009–2012 гг. (%)

Заслуживают внимания также имевшие место факты регистрации единичных локальных вспышек заболеваемости в организованных детских коллективах. Если коснуться отдельно ЭВ менингитов, то их цикличность имела значительные отличия от цикличности суммарных ЭВИ. В многолетней динамике ЭВ менингитов отклонения фактических показателей заболеваемости от уровней тенденции (криволинейная) выявили один полный цикл продолжительностью 5 лет (с учетом ограниченной длительности наблюдения). Так, с 2008 по 2011 гг. в динамике заболеваемости ЭВ менингитами отмечалось ежегодное статистически достоверное снижение ($P<0,05$) показателей, а в 2012 г. она приобрела направленность к росту (рисунок 8).

Рисунок 8 — Динамика заболеваемости ЭВ менингитами в РБ (2008–2012 гг.)

При этом в 2012 г. умеренные подъемы ЭВ менингитов (рисунок 9) отмечались на территориях большинства областей и г. Минска (за исключение Минской и Могилевской областей). Наиболее значительный подъем имел место в Гомельской области. Среди населения области зарегистрировано 47% всех случаев ЭВ менингитов за 2012 г. По сравнению с предыдущим годом показатель увеличился почти в 13 раз — с 0,35 до 4,47 на 100 тыс., что в 3 раза превысило республиканский уровень. Сезонный подъем ЭВ менингитов в данном регионе отмечался с июля по октябрь.

Аналогичная динамика заболеваемости ЭВ менингитами с тенденцией к росту в ряде регионов страны наблюдалась и в первом полугодии 2013 г. (рисунок 9).

Следует отметить, что подъем суммарной заболеваемости ЭВИ и рост заболеваемости ЭВ менингитами в 2012 г. проходили на фоне увеличения частоты выделения энтеровирусов (ЭВ) из объектов внешней среды, в т. ч. из питьевой воды (рисунок 10), что было особенно характерным для тех регионах республики (Брестская, Гомельская области, г. Минск), в которых отмечались более высокие ее показатели.

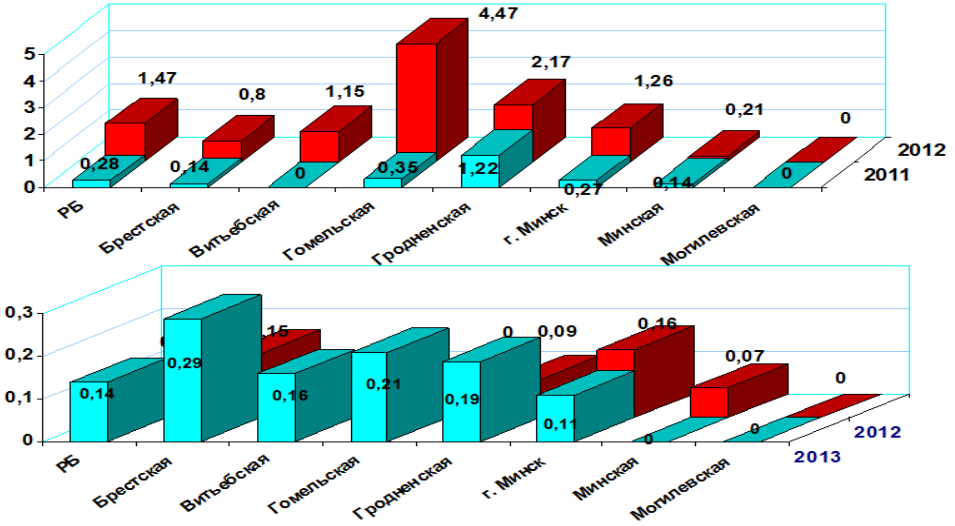



Рисунок 9 — Сравнительная заболеваемость ЭВ менингитами в разрезе территорий и РБ за 2011–2012 гг. и 6 мес. 2013 г. (на 100 тыс.)

По результатам осуществляемого на территории Беларуси санитарно-вирусологического контроля качества питьевых вод уровень их энтеровирусного загрязнения в последние 5 лет колебался в пределах от 1,57 до 0,52% [15]. При этом динамика уровней циркуляции ЭВ в водных объектах соответствовала таковой в человеческой популяции (рисунок 10), что является косвенным доказательством определенной роли водного фактора в поддержании энтеровирусной заболеваемости среди населения.

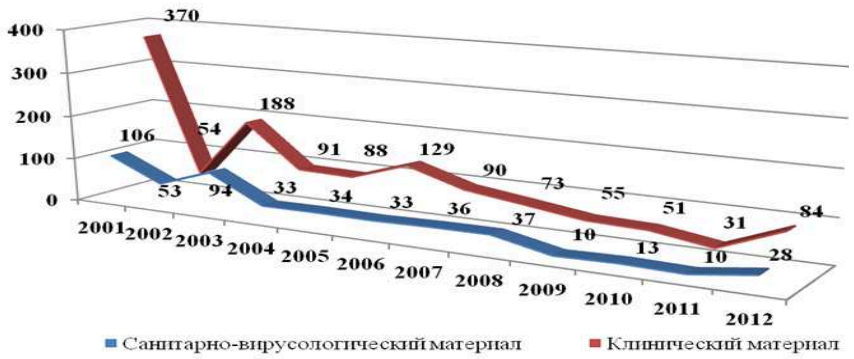



Рисунок 10 — Динамика выделения ЭВ из водных объектов и из клинического материала (2001–2012 гг.)

Об этом свидетельствуют также результаты сравнительного анализа помесячной заболеваемости энтеровирусным менингитом в 2012 г. в одном из крупных белорусских городов и помесячной динамики выявления энтеровирусного загрязнения питьевой воды в этом же городе. Как оказалось, сезонный подъем заболеваемости ЭВ менингитами (конец лета – осень) (рисунок 11) коррелировал с увеличением уровней обнаружения ЭВ в питьевой воде со сдвигом 2-4 недели, соответствующим одному-двум инкубационным периодам инфекции (рисунок 12).

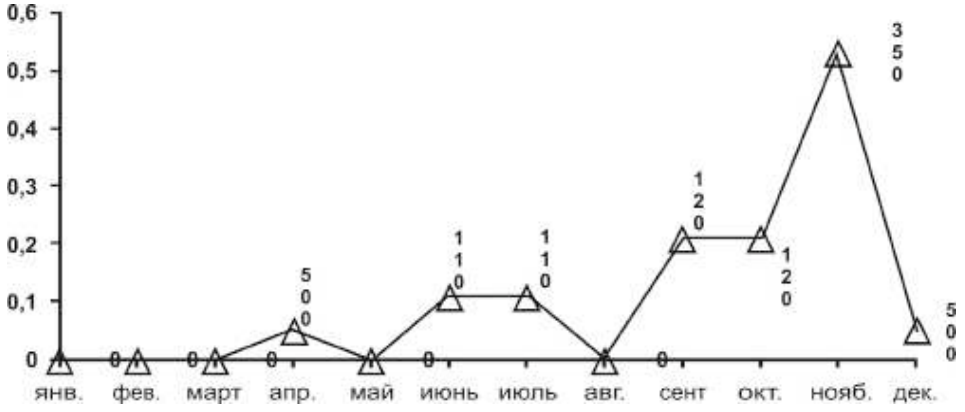



Рисунок 11 — Помесячная динамика заболеваемости энтеровирусным менингитом в городе N за 2012 г. (на 100 тыс. населения)

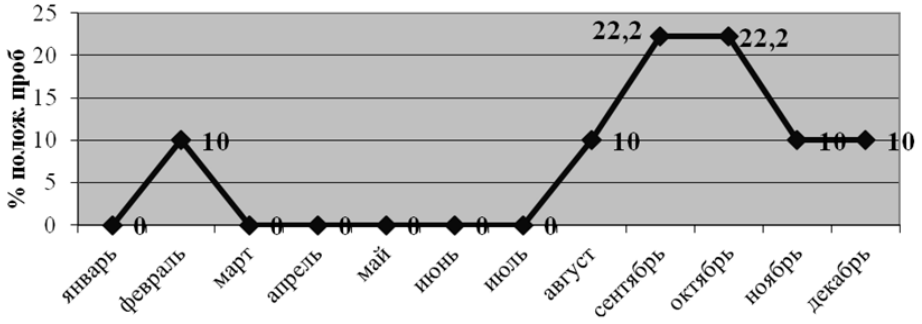



Рисунок 12 — Помесячная динамика выявления энтеровирусной контаминации питьевой воды в городе N (2012 г.)

Следует отметить, в 2012 г. имело место расширение типового спектра ЭВ (ЕСНО 5, 6, 11, 19, 24, 30; Coxsackie B 1, 3, 4, 5) с циркуляцией среди населения высокопатогенного «вспышечного» вируса ЕСНО 30, регулярно вызывающего обострения эпидситуации в разных странах мира. Как известно, данный серотип в последние два десятилетия был весьма эпидемически значимым и для нашей страны. Именно он вызвал ряд вспышек заболеваемости в разных регионах Беларуси, четыре из которых были связаны с вирусным загрязнением водопроводной воды в крупных областных центрах: Гомеле (1997), Витебске (2001), Гродно (2003), а также в Минске (2003) [16]. Пострадало более 2 тыс. человек, в основном дети до 14 лет. С периодичностью в 10 лет вирус ЕСНО 30 вновь стал доминирующим этиологическим агентом ЭВ менингитов, зарегистрированных в июле–августе 2013 г. на территории г. Витебска и области, а также г. Гомеля и области. По результатам проведенных нами молекулярно-эпидемиологических исследований Витебский эпидемический генотип ЕСНО 30 имел тесное генетического родство к вирусам ЕСНО 30, вызвавшим крупнейшую по своим масштабам вспышку ЭВИ в 2011 г. в Китае [11], а также групповую заболеваемость ЭВ менингитами в июле 2013 г. в г. Москве (рисунок 13).

Эти данные указывают на возможный занос «вспышечного» вируса в нашу страну в условиях существующего единого мирового эпидемического пространства. Подтверждением тому является информация из доступных электронных источников о не вполне благоприятной эпидобстановке по ЭВИ в соседних с Беларусью странах.

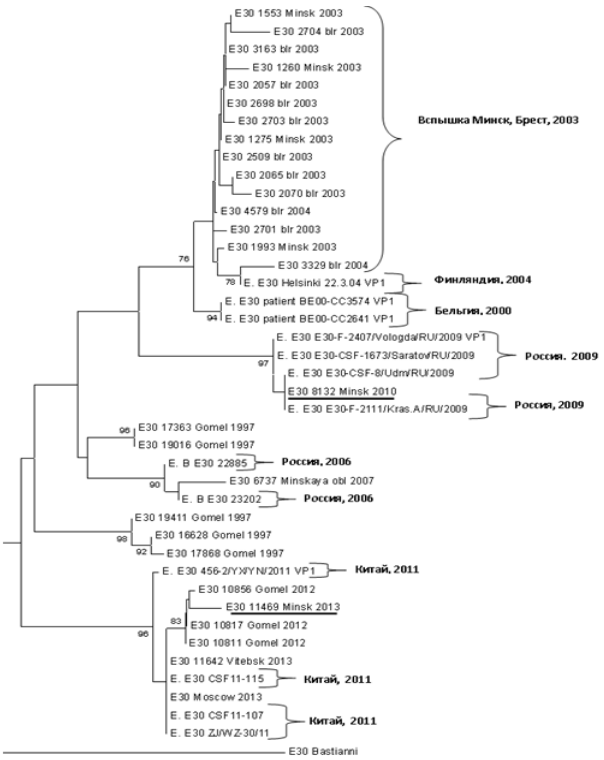



Рисунок 13 — Филогенетическое древо штаммов ЭКХО 30, циркулировавших в РБ с 1997 по 2013 гг. и наиболее сходных с ними вирусов из других стран мира

Так, в Российской Федерации с июня 2013 г. отмечается подъем энтеровирусных менингитов, зарегистрированы вспышки заболеваемости в организованных детских коллективах в Ростове-на-Дону, Сочи, Липецке, Нижнем Новгороде, Москве. В июле осложнения эпидситуации по энтеровирусным менингитам продолжали регистрироваться в Тульской области, Краснодарском крае и Мордовии. Появилась также информация о существенном увеличении заболеваемости энтеровирусными менингитами в Украине (Львовская область), а также в шести округах Эстонии.

Кроме вышеуказанного вируса ЕСНО 30 серьезную эпидемическую значимость, особенно в странах Азии, имел ЭВ 71 типа, который явился причиной многочисленных вспышек, в т. ч. с фатальными исходами [11]. Из последних событий наиболее значительная вспышка, вызванная ЭВ 71 типа, была зарегистрирована в 2012 г. в Камбодже, а также в России (г. Ростов на Дону) в июле 2013 г. Важно заметить, что по результатам 20-летних наблюдений на территории Республики Беларусь ЭВ 71 типа не регистрировался.

**Выводы.** Наблюдаемая сегодня в мире и в нашей стране эпидемиологическая ситуация по ЭВИ диктует необходимость регулярного надзора и молекулярно-эпидемиологического контроля над ее возбудителями как на государственном, так и международном уровнях с учетом единого эпидемического пространства и реальной возможности активных трансграничных переносов энтеровирусных патогенов. Для его осуществления в Республике Беларусь создана самая современная методическая база, разработана серия отечественных диагностических и санитарно-вирусологических препаратов, успешно работают высококвалифицированные научные кадры, постоянно готовятся специалисты для практического здравоохранения. Среди актуальных проблем, требующих своего скорейшего решения, можно отметить следующие: необходимость укрепления практической лабораторной службы (на уровне ЦГЭ и профильных ЛПУ) современным оборудованием и высокопрофессиональными кадрами, более активное внедрение в практику современных методов исследований, в т. ч. генодиагностику, налаживание более тесного взаимодействия и результативного сотрудничества специалистов разных ведомств, в той или иной степени отвечающих за здоровье нации (медиков, работников образования, жилищно-коммунального и водного хозяйства, пищевой промышленности и др.), совершенствование и развитие документов водно-санитарного законода-

тельства, касающихся контроля качества питьевых вод и пищевых продуктов по вирусологическим показателям, развитие научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в области создания и импортазамещения эффективных средств для диагностики ЭВИ и индикации их возбудителей в объектах окружающей среды, а также в направлении изучения и оценки риска вирусного загрязнения воды и пищи для здоровья людей.

**Литература**

1. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents / T.V. Amvrosieva [et al.] // Cent. Eur. J. Public Health. — 2006. — Vol. 14, № 2. — P. 67–73.
2. Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005 / J. Jacques [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46, № 1. — P. 206–213.
3. Molecular diagnosis of echovirus 30 as the etiological agent in an outbreak of aseptic meningitis in Panama: May–June 2008 / A. Martinez [et al.] // J. Infect. Dev. Ctries. — 2012. — Vol. 6, № 12. — P. 836–841.
4. Identification and phylogenic analysis of coxsackievirus B5 during an outbreak of aseptic meningitis in Shandong / H.Y. Wang [et al.] // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. — 2010. — Vol. 31. — P. 64–68.
5. Genetic characterization of a Coxsackie A9 virus associated with aseptic meningitis in Alberta, Canada in 2010 / K. Pabbaraju [et al.] // Virol. J. — 2013. — Vol. 10. — P. 1–9.
6. A molecular investigative approach to anoutbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Egypt, October 2010 / E.A. Ayoub [et al.] // Virol. J. — 2013. — Vol. 10. — P. 10–19.
7. Phylogenetic and molecular characterization of coxsackievirus A24 variant isolates from a 2010 acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak in Guangdong, China / W. De [et al.] // Virol. J. — 2012. — Vol. 9. — P. 41–50.
8. Molecular identification and phylogenetic study of coxsackievirus A24 variant isolated from an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in India in 2010 / D. Shukla [et al.] // Arch. Virol. — 2013. — Vol. 158. — P. 679–684.
9. Characterization of an Outbreak of Hand, Foot, and Mouth Disease in Nanchang, China in 2010 / M.Y. Liu [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — P. 1– 9.
10. Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6 / K. Flett [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 18. — P. 1702–1703.
11. A viral meningitis outbreak associated with Echo30 in drinking water / X.D. Lu [et al.] // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. — 2012. — Vol. 33. — P. 1067–1071.
12. Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus / T.V. Amvrosieva [et al.]// Cent. Eur. J. Public Health. — 2001. — Vol. 9, № 3. — P. 154–157.
13. Гигиеническая оценка особенностей водной вспышки энтеровирусной инфекции в г. Витебске / С.Г. Позин [и др.] // Здоровье и окружающая среда: сб. ст. — Барановичи, 2002. — С. 134–143.
14. Проблема энтеровирусных инфекций в Республике Беларусь / Т.В. Амвросьева [и др.] // Материалы науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию медико-профилактического факультета БГМУ. — Минск, 2004. —Ч. I. — С. 63–67.
15. Амвросьева, Т.В. Вода как эпидемически значимый фактор передачи вирусных инфекций / Т.В. Амвросьева, З.Ф. Богуш // Наука, образование производство в решении экологических проблем (ECOLOGY-2011): сб. науч. ст. 8-й международ. науч.-техн. конф., Уфа, Россия. — Уфа, 2011. — № 2. — С. 231–236.
16. Молекулярная характеристика и филогенетический анализ энтеровирусов, вызвавших вспышки и сезонные подъемы заболеваемости в разных регионах Республики Беларусь / Т.В. Амвросьева [и др.] // ЖМЭИ. — 2006. — № 3. — С. 17–21.

## THE CURRENT STATE OF THE ENTEROVIRAL INFECTIONS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**Amvrosieva T.V.[1], Zueva V.L.[2], Paklonskaya N.V.[1], Bohush Z.F.[1], Dziadziulia K.L.[1]**

*[1]Research and Practical Centre for Epidemiology and Microbiology;*

*[2]State Republican Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus*

The current situation of human nonpoliomiyelitny enteroviral infections (EVI) in the world and in Belarus is analysed. The features of epidemiological process development in our country are stated in details. The dynamics of incidence in the past decade is presented. The structure of EVI's registered in the recent years broken down by administrative territories, clinical forms, age groups, influences of seasonal factors is described. Special attention is paid to the characteristic of EVI outbreaks with the description of its dominating etiological agents. The up-to-date concept on the improvement of the epidemiological surveillance of EVI in the Republic of Belarus is specified.

**Keywords:** enteroviral infection, enteroviral meningitis, incidence, clinical form, age composition, outbreak, enteroviruses, epidemiological surveillance.

Поступила 02.09.2013

# КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С БЫСТРЫМ ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

**Анищенко Е.В., Красавцев Е.Л., Кармазин В.В., Казначеева Е.П.**

*Гомельский государственный медицинский университет;*

*Гомельская областная клиническая инфекционная больница, Гомель, Беларусь*

**Резюме.** Проанализированы данные 17 медицинских карт детей областного консультативно-диспансерного кабинета ВИЧ/СПИД Гомельской областной инфекционной клинической больницы, инфицированных вертикальным путем, у которых наблюдалось быстрое прогрессирование ВИЧ-инфекции (на первом году жизни). В стадии СПИДа находилось 8 пациентов (47%). У большей части детей уровень вирусной нагрузки составил 800000 копий/мл и более. Большинство детей находились в состоянии выраженной иммуносупрессии. Практически у всех были диагностированы генерализованная лимфоаденопатия и орофарингеальный кандидоз. У 3 (18%) пациентов диагностировалась врожденная генерализованняя цитомегаловирусная инфекция.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, дети, быстрое прогрессирование ВИЧ-инфекции.

**Введение.** У детей ВИЧ-инфекция прогрессирует быстрее, чем у взрослых, и скорость прогрессирования у них различна [1–3]. У младших детей, инфицированных перинатально, ВИЧ-инфекция протекает тяжелее и стремительнее. По данным литературы, у этих детей при отсутствии профилактического лечения в 14% диагностируется СПИД в течение 1-го года их жизни, в 11–12% диагноз СПИД устанавливается в каждый последующий год, а к 4 году жизни у половины инфицированных детей устанавливается диагноз конечной фазы болезни — СПИДа [4–6].

По мнению других авторов, у 72–80% детей отмечается медленно прогрессирующее течение заболевания: средний возраст развития СПИДа составляет 6,7 лет. У них достаточно медленно прогрессируют нарушения в иммунной системе, в связи с чем тяжелые оппортунистические инфекции, злокачественные опухоли и полиорганная патология развиваются в поздние сроки после инфицирования ВИЧ.

Быстро прогрессирующее течение развивается у 20–28% детей, инфицированных ВИЧ, как правило, в антенатальном периоде, у которых глубокая иммуносупрессия и клиника стадии вторичных заболеваний имеют место уже при рождении или возникают в грудном возрасте. Они умирают в течение 1 года жизни, средний возраст возникновения СПИДа — 4 мес. [7].

ВИЧ-инфекция у ребенка раннего возраста всегда протекает на фоне высокой вирусной нагрузки. На фоне незрелости иммунной системы и большого числа клеток-мишеней высокий уровень вирусной нагрузки может сохраняться на протяжении нескольких лет. Однако в отличие от взрослых не существует четкой зависимости между уровнем вирусной нагрузки ребенка и частотой прогрессирования ВИЧ. Если у взрослых больных уровень вирусной нагрузки 100000 и более коп/мл является бесспорным показателям назначения антиретровирусной терапии, то у детей раннего возраста не существует такого однозначного критерия. Только очень высокий уровень РНК ВИЧ (>299000 коп/мл) четко ассоциируется с прогрессированием заболевания и наступлением смерти, однако такие показатели вирусной нагрузки у детей встречаются редко [7].

В норме число CD4+ Т-лимфоцитов у детей значительно выше, чем у взрослых. Количество Т-клеток у них становится таким же, как у взрослых примерно к 6-летнему возрасту. Количество клеток CD4+ и их деление на популяции может быть использовано в качестве суррогатного маркера прогрессирования ВИЧ-инфекции. Глубокие изменения в составе и количестве CD4+ клеток в течение первого года жизни характеризуют быстрое прогрессирование ВИЧ-инфекции.

У детей не определены четкие значения лабораторных показателей, позволяющие диагностировать вариант течения ВИЧ-инфекции [1–3].

**Цель:** изучение клинико-лабораторных особенностей ВИЧ-инфекции у детей с быстрым прогрессированием заболевания.

**Материалы и методы.** Проанализированы данные 17 медицинских карт детей областного консультативно-диспансерного кабинета ВИЧ/СПИД Гомельской областной инфекционной клинической больницы, инфицированных вертикальным путем.

Дети были обследованы согласно протоколам «Оптимизация подходов к наблюдению и лечению детей с ВИЧ/СПИДОМ (инструкция по применению)» и регламентирующими документами

Министерства здравоохранения (приказы МЗ РБ № 147 от 05.09.03, № 61-А от 06.02.04, № 132 от 17.03.04 и др.).

Диагноз ВИЧ-инфекции считали подтвержденным, если ребенок младше 18 мес. имел положительный результат в качественной полимеразной цепной реакции ВИЧ в двух пробах крови, взятых в разное время (2 и 4 мес.), отмечалось наличие антител к ВИЧ в иммуноферментном анализе и иммуноблотинге, не менее чем в двух исследованиях крови (для детей старше 18 мес.) или у ребенка имело место верифицированное СПИД-индикаторное заболевание.

Для оценки стадий ВИЧ-инфекции использовалась классификация ВИЧ-инфекции у детей CDC 1994 г., которая наряду с клиническими категориями включает иммунологические критерии степени тяжести процесса [8].

Вирусную нагрузку определяли методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (Real time PCR). Экстракция из клинических образцов плазмы наборами реагентов фирмы ЗАО « Реал Бест». Второй этап амплификации проводился наборами реактивов этой же фирмы. Интерпритация результатов осуществлялась амплификатором « Rotor Gene 3000» фирмы Corbett-research.

Абсолютное и процентное содержание уровня CD4+ и CD8+ лимфоцитов в крови проводили на оборудовании фирмы Partec (проточный цитофлюориметр) mini POC с использованием моноклональных антител фирмы Partec.

После установления диагноза ВИЧ-инфекции у всех детей, согласно протоколам обследования, определялась ДНК возбудителей группы оппортунистических инфекций (цитомегаловирус, вирус простого герпеса, вирус Эпштейна-Барр, токсоплазма). Наборами реагентов «АмплиСенс CMV-FL, EBV-FL, TOX-Fl, HSV 1, 2 –FL» выявляли ДНК CMV, ДНК EBV, ДНК TOX, ДНК HSV 1,2 путем амплификации специфического фрагмента ДНК данных вирусов методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Пациенты обследовались также на маркеры вирусных гепатитов В и С (иммуноферментный метод), определялись грибы рода *Candida* (в диагностически значимых титрах) в мазке из слизистой полости рта методом микологического посева на питательные среды (Сабуро, агар Никерсона).

Критерием быстрого прогрессирования заболевания считали наличие у ребенка клинической категории В или С (по классификации CDC 1994 г.), которые развились на первом году жизни.

**Результаты и их обсуждение.** Средний возраст детей к моменту установления диагноза ВИЧ-инфекции с быстрым прогрессированием заболевания составил 0,7±0,07 мес.. Двум детям (11,7%) ВИЧ-статус был подтвержден в возрасте 1 и 2 мес. жизни. У обоих была диагностирована врожденная генерализованная цитомегаловирусная инфекция.

Антиретровирусная профилактика для снижения перинатальной передачи ВИЧ-инфекции от матери к плоду применялась у 13 человек (76%). Она включала полную профилактику (и матери, и ребенку) и неполную (или только матери, или только ребенку). У 8 (61,5%) детей она была полной и у 5 (38,5%) детей антиретровирусная профилактика применялась только у матери или только у ребенка.

В стадии СПИДа находилось 8 детей (47%). При оценке физического развития по центильным таблицам при рождении среднегармоничными оказались только 2 детей (12%). Большая часть детей (8 человек, 47%) родилась с дефицитом массы тела 1–2 степени.

Результаты лабораторных исследований (количество эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина) приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели лабораторных исследований крови ВИЧ-инфицированных новорожденных в 1-е сут жизни

| Лабораторные показатели | ВИЧ-инфицированные дети с быстрым прогрессированием заболевания (M±m) |
|---|---|
| Эритроциты, $10^{12}$/л | 5,3±0,3 |
| Гемоглобин, г/л | 187,7±8,9 |
| Лейкоциты, $10^{9}$/л | 15,9±1,7 |
| Тромбоциты, $10^{9}$/л | 260±16,7 |

Показатели периферической крови в 1-е сут жизни детей из группы с быстрым прогрессированием заболевания не отличались от аналогичных показателей у здоровых новорожденных [9, 10].

Результаты выявления маркеров группы оппортунистических инфекций в зависимости от клинической категории представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Выявление маркеров оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных детей в зависимости от клинической категории

| Клиническая категория | Маркеры оппортунистических инфекций | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ДНК CMV | ДНК EBV | ДНК TOX | Маркеры ВГ | ДНК HSV | Candida |
| B (n=9) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (11%) |
| C (n=8) | 2 (25%) | 0 | 0 | 0 | 1 (12%) | 5 (62,5%) |

Наиболее часто из группы маркеров оппортунистических инфекций у детей выявлялись в диагностически значимых титрах грибы рода *Candida* (35%) и ДНК CMV (11,7%).

По нашим данным, у 11 детей (64,5%) уровень вирусной нагрузки составил 800000 копий/мл и более. Только у 2 (11,7%) пациентов этот показатель составил менее 300000 копий/мл и у 4 человек (23,5%) вирусная нагрузка была в пределах от 300000 до 800000 копий/мл.

Количество CD4+ и CD8+ лимфоцитов у детей с быстрым прогрессированием ВИЧ-инфекции составило 16,2±2,2% (429±77 клетки) и 54,2±5,3% (2494±633 клетки) соответственно. Согласно классификации CDC 1994 г., 3 детей (17,6%) находились в 1 иммунологической категории (нет иммуносупрессии, уровень CD4 ≥25%), 4 ребенка (23,5%) были отнесены ко 2 иммунологической категории (умеренная иммуносупрессия, уровень CD4 =25-15%) и 10 детей (58,8%) находились в 3 иммунологической категории (выраженная иммуносупрессия, уровень CD4 <15%).

Клинические проявления ВИЧ-инфекции в группе обследованных детей представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Клинические проявления ВИЧ-инфекции у детей с быстрым прогрессированием заболевания

| Синдромы заболевания | Частота встречаемости (n, %) |
|---|---|
| Генерализованная лимфаденопатия | 17 (100%) |
| Орофарингеальный кандидоз | 13 (76,4%) |
| Гепатоспленомегалия | 12 (70,5%) |
| Пневмония | 12(70,5%) |
| Задержка психомоторного развития | 12(70,5%) |
| Анемия | 9 (52,9%) |
| Тромбоцитопения | 4 (23,5%) |
| Рецидивирующие респираторно-вирусные инфекции | 3 (17,6%) |
| Генерализованная цитомегаловирусная инфекция | 3 (17,6%) |
| Распространенный кандидоз( орофарингеальный, пищевода, кишечника) | 2 (11,7%) |
| Менингоэнцефалит | 1 (5,8%) |

Практически у всех детей встречались генерализованная лимфоаденопатия и орофарингеальный кандидоз. Распространенный кандидоз (орофарингеальный, пищевода, кишечника) наблюдался у 3 детей (17,6%). Одинаково часто встречались гепатоспленомегалия, пневмония и задержка психомотрного развития (70,5%). Пневмоцистная пневмония была у 3 детей (25%).

Генерализованняя цитомегаловирусная инфекция у 3 детей (17,6%) была врожденной. Она протекала с поражением головного мозга и была подтверждена лабораторно (выявлялись ДНК CMV в крови и ликворе) у 2 детей (66%).

**Выводы.** Антиретровирусная профилактика для снижения перинатальной передачи ВИЧ-инфекции от матери к плоду применялась только у 13 детей с быстрым прогрессированием ВИЧ-инфекции на первом году жизни (76%). В стадии СПИДа находилось 8 пациентов (47%) при уста-

новлении ВИЧ-статуса. При оценке физического развития по центильным таблицам при рождении среднегармоничными оказались только 2 детей (11,7%). У 64,5% детей уровень вирусной нагрузки составил 800000 копий/мл и более. В состоянии выраженной иммуносупрессии находились 10 детей (58,8%). Наиболее часто из группы маркеров оппортунистических инфекций у детей выявлялись в диагностически значимых титрах грибы рода *Candida*. Наиболее часто у детей с быстрым прогрессированием заболевания встречались генерализованная лимфаденопатия и орофарингеальный кандидоз. У 3 (17,6%) детей диагностировалась врожденная генерализованняя цитомегаловирусная инфекция.

**Литература**

1. Рахманова, А.Г. ВИЧ–инфекция у детей / А.Г. Рахманова, Е.Е. Воронин, Ю.А.Фомин. — СПб.: Питер, 2003. — 448 с.
2. Textbook of pediatric HIV care / S. Zeichner [et al.]. — Cambrige, 2005. — 784 p.
3. Фризе, К. Инфекционные заболевания беременных и новорожденных: пер. с нем. / К. Фризе, В. Кахель. — М.: Медицина, 2003. — 424 с.
4. Белозеров, Е.С. ВИЧ-инфекция / Е.С. Белозеров, Е.И. Змушко. — 2-е изд. — СПб., 2003. — 368 с.
5. Петрович, И.В. Оппортунистические инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов: пособие для практ. врачей / И.В. Петрович, Н.В. Голобородько. — Минск, 2004. — 24 с.
6. Villamor, E. Weight loss during pregnancy is associated with adverse pregnancy outcomes among HIV-1 infected women / E. Villamor [et al.] // J. Nutr. — 2004. — Vol. 134. — P. 1424–1431.
7. ВИЧ-инфекция у взрослых и детей / Н.В. Матиевская [и др.] // Оппортунистические инфекции и заболевания: пособие для студентов лечеб., педиатр., мед.-психол. и мед.-диагн. фак-в. — Гродно: ГрГМУ, 2011. — 400 с.
8. Centers for Disease Control and Prevention. 1994 revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years // MMWR.— 1994. — 43 (RR-12). — P. 1–10.
9. Шабалов, Н.П. Детские болезни : учеб.: в 2 т. / Н.П. Шабалов. — М.; СПб.: Питер, 2005. — Т. 1. — 830 с.
10. Шабалов, Н.П. Детские болезни: учеб.: в 2 т. / Н.П. Шабалов. — М.; СПб.: Питер, 2005. — Т. 2. — 734 с.

## CLINICAL AND LABORATORY FEATURES OF HIV INFECTION IN CHILDREN WITH RAPID DISEASE PROGRESSION

**Anischenko E.V., Krasavtsev E.L., Karmazin V.V., Kaznacheeva E.P.**

*Gomel State Medical University;*

*Gomel Regional Clinical Hospital of Infectious Hospital, Gomel, Belarus*

Medical records of 17 children infected via vertical transmission with a rapid progression of HIV infection in the first year of life were analyzed. In 8 children (47%) AIDS stage was diagnosed. Viral load of 800.000 copies/mL or greater was observed in 11 children (65%). In a state of severe immunosuppression were majority of children (59%). Almost in all children generalized lymphadenopathy and oropharyngeal candidiasis have been diagnosed. In 3 (18%) children generalized congenital cytomegalovirus infection was diagnosed.

**Keywords:** HIV-infection, children, rapid progression.

Поступила 02.09.2013

## ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ МОНИТОРИНГА СОЧЕТАННЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ

**Виноград Н.А., Васылышин З.П., Козак Л.П.**

*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого МЗ Украины, Львов, Украина*

**Резюме.** По данным многолетних исследований с использованием принципов госпитального надзора и сероэпидемиологического мониторинга установлен высокий эпидемический потенциал сочетанных природных очагов зооантропонозных инфекций в западном регионе Украины. Верифицированы как моноинфекции, так и сочетанное заражение людей возбудителями природно-очаговых инфекций: вирусного клещевого энцефалита, иксодовых клещевых боррелиозов, геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Подтверждено функционирование сочетанных природных очагов по данным изучения популяционного иммунитета совокупного населения. Определен

спектр актуальных для региона возбудителей особо опасных инфекций, обосновано необходимость модернизации системы мониторинга сочетанных природно-очаговых инфекций в блоке лабораторного контроля на эндемических территориях.

**Ключевые слова:** сочетанные природные очаги, особо опасные инфекции, мониторинг, микст-инфекции.

**Введение.** Формирование природных очагов особо опасных инфекций и опасных инфекционных заболеваний на территории Украины обусловлено комплексом климатогеографических характеристик и особенностями современного этапа. Среди биотических факторов, влияющих на формирование природных очагов инфекционных болезней, большое значение имеют влажность почвы, температура воздуха, характер рельефа, флорофаунистические комплексы территории определяют пространственные характеристики природно-очаговых инфекций [1, 2].

Существенное антропогенное влияние приводит к изменению структуры природных очагов, возникновению новых или исчезновению известных заболеваний в результате интродукции или ликвидации возбудителей. Обнаружение ранее неизвестных инфекций связано с увеличением контактов с очагами, улучшением диагностики, изменением экологии возбудителей. При возвращающихся инфекциях особое значение имеют циклические изменения очагов, их трансформация, количественные и качественные изменения популяций возбудителей, сочетанность очагов. Изменение климата, связанное с глобальным потепление, существенно изменяет видовую структуры возбудителей в природных очагах, что манифестирует возникновение ряда болезней, ранее не характерных для территории [3, 4].

В Украине инвентаризированы природные очаги, где существует реальный природный потенциал биологической опасности вследствие циркуляции ряда возбудителей зооантропонозных природно-очаговых инфекций: трансмиссивных (клещевого энцефалита, иксодовых клещевых боррелиозов, туляремии, риккетсиозов) и нетрансмиссивных (геморрагической лихорадки с почечным синдромом, лептоспироза, бруцеллеза). Преимущественно функционируют сочетанные очаги с одновременной циркуляцией нескольких возбудителей за счет наличия общих животных-резервуаров, а при трансмиссивных инфекциях — векторов, а также тесных трофических связей между ними. Эволюция паразитарных систем зооантропонозных и сапроантропонозных инфекций при одновременной циркуляции нескольких патогенов сопровождается различными вариантами сосуществования возбудителей в объектах, являющихся резервуарами для конкретных возбудителей. Наивысший потенциал к стабильной циркуляции в очагах имеют микроорганизмы с более высокими показателями полигостальности, несколькими эволюционно закрепленными способами распространения между восприимчивыми объектами, адекватными механизмами защиты от неблагоприятных условий окружающей среды и иммунных механизмов хозяина [2, 3, 5].

Циркуляция возбудителей особо опасных и опасных инфекционных заболеваний в природных очагах манифестирует инфекционными заболеваниями людей. Клиническое течение этих заболеваний полиморфное с поражением разных систем и органов, тенденцией к хронизации и длительной реконвалесценции. Однако, это лишь видимая часть проблемы, а о реальной картине более информативными являются результаты сероэпидемиологических исследований населения этих территорий [6, 7, 8].

Последние десятилетия в Украине несколько снизились возможности контроля функционирования природных очагов, как и объемы проведения научных исследований в этом направлении, что не позволяет адекватно оценить эпидситуацию. Исследования, проведенные в разных регионах Украины, свидетельствуют об интенсификации эпизоото-эпидемической ситуации в разных регионах страны [1, 2, 5, 6, 9, 10].

Введение новых стандартов мониторинга, в частности, с использованием рекомендаций ВОЗ, расширяет возможности изучения структуры и динамики развития паразитарных систем в очагах, спектра и свойств циркулирующих патогенных биологических агентов, что повышает качество прогнозирования эпизоото-эпидемической ситуации. Это важно и на этапе верификации диагнозов инфекционных состояний, когда микст-инфицирование несколькими патогенами может влиять на эффективность и качество лабораторной диагностики, в частности за счет общих эпитопов, антигенных перекрестных реакций и т. п. [4–7, 9, 10].

Принципиальные отличия природных очагов за счет циркуляции возбудителей разной патогенности, особенностей пространственного расположения резервуаров и векторов, их плотности и

зараженности, способствуют формированию природных очагов разной степени сложности, напряженности и активности («действующих» и «молчаливых»), что требует адаптации алгоритма их мониторинга, а также унификации определения случая конкретных нозологий [6–8, 10].

Оптимизация эпидмониторинга природно-очаговых инфекций должна предусматривать проведение госпитального надзора по синдромальному принципу; сероэпидемиологического мониторинга совокупного населения — когортные исследования; углубленных молекулярно-генетических исследований циркулирующих штаммов возбудителей; энтомологических, зоопаразитологических, экологических и других исследований.

**Цель:** изучение видового состава возбудителей природно-очаговых инфекций, циркулирующих среди людей в западноукраинском регионе, по данным результатов госпитального надзора и сероэпидемиологического мониторинга как маркеров оценки этиологической структуры природных очагов. В задачи исследований входило оценка распространенности указанной патологии с учетом ландшафтно-географических зон (горы, смешанный рельеф, равнина), характера вариантов инфицирования людей (моно- и сочетанных), клинической манифестации заболеваний.

**Материалы и методы.** Нами проведено исследование методом иммуно-ферментного анализа 2686 сывороток крови 1737 пациентов с сезонными лихорадочными состояниями, находившихся на лечении в инфекционных стационарах. Отбор больных для серологических обследований проводился по расширенному синдромальному принципу, что было обусловлено полиморфизмом клинических проявлений данной группы заболеваний. В когортных исследованиях с помощью случайной выборки двукратно с интервалом в один год серологически обследовано 2000 здоровых лиц для определения иммуноглобулинов класса G к вирусам клещевого энцефалита, геморрагической лихорадке с почечным синдромом и боррелиям. Анализ полученных результатов проводили с учетом территориального принципа, учитывая климатические и флорофаунистические характеристики, эпидемиологические данные, полученные при анкетировании обследованных лиц.

**Результаты и их обсуждение.** Для определения на конкретных территориях спектра циркулирующих возбудителей природно-очаговых инфекций, представляющих медицинский интерес, проводили исследование за двумя принципами: госпитального надзора и сероэпидемиологического мониторинга.

Результаты исследований в разрезе госпитального надзора позволили определить высокие показатели пораженности населения возбудителями природно-очаговых инфекций, о чем свидетельствовало выявление в парных сыворотках крови (64,7±1,15)% обследованных больных антител класса IgM к различным патогенам. Так, было показано инфицирование людей возбудителями вирусного клещевого энцефалита, иксодового клещевого боррелиоза, коксиеллёза и иных недифференцированных риккетсиозов, геморрагической лихорадки с почечным синдромом, лихорадки Западного Нила, лихорадки Синдбис, лептоспироза, бруцеллеза.

При этом следует отметить, что в большинстве случаев имело место заражение людей одним возбудителем, однако более трети пациентов были одновременно инфицированы двумя или более патогенами из группы природно-очаговых инфекций. В последнем случае установлено как инфицирование разными возбудителями, так и разными серотипами одного возбудителя (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом).

Из общего количества обследованных больных детально проанализированы клинические и эпидемиологические карты 764 пациентов, у 465 ((60,9±1,8)%, $p<0,05$) из них верифицированы природно-очаговые инфекции, при этом в 69 ((14,8±1,6)%) случаях выявлено микст-инфицирование разными патогенными биологическими агентами.

Анализ пространственного распределения случаев показал, что микст- инфицирования происходили на всех исследуемых территориях (семь районов запада Украины), однако их количество было достоверно выше на равнине и территориях со смешанным рельефом, по сравнению с горными районами.

Анализ случаев микст-инфекций у пациентов показал, что у большинства было заражение двумя патогенами ((81,2±4,7)%), при чем (66,1±6,3)% из них представляли ассоциации «клещевых» патогенов – вирусного клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза. У остальных (33,9±6,3)% пациентов обнаружены следующие комбинации зооантропонозных патогенов: возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом и лептоспироза — (12,5±4,4)%, геморра-

гической лихорадки с почечным синдромом и недифференцированных риккетсиозов — (8,9±3,8) % и геморрагической лихорадки с почечным синдромом и коксиеллеза — (12,5±4,4) % случаев.

Таким образом, обнаруженные случаи одновременного сочетанного инфицирования людей возбудителями природно-очаговых инфекций в различных комбинациях патогенов, по нашему мнению, подтверждают функционирование сочетанных природных очагов на указанных территориях. Очевидно, заражения людей возможны как за счет общих переносчиков при трансмиссивных инфекциях, так и иными путями — при нетрансмиссивных и трансмиссивных инфекциях с факультативным трансмиссивным механизмом передачи возбудителей.

Кроме того, у 9 (13,0±4,0)% пациентов были выявлены одновременно антитела к трем патогенам: хантавирусам, лептоспирам и недифференцированным до вида риккетсиям (2 случая — (2,9±2,0)%); хантавирусам, вирусу клещевого энцефалита и недифференцированным до вида риккетсиям (1 случай — (1,4±1,4)%); хантавирусам, вирусу клещевого энцефалита и коксиеллам (1 случай — (1,4±1,4)%); хантавирусам, коксиеллам и боррелиям (1 случай — (1,4±1,4)%). В 4 ((5,8±2,8)%) случаях у пациентов одновременно подтверждено наличие лептоспир и двух серотипов хантавирусов (Dobrava и Puumala). У двух больных ((2,9±2,0)%) были обнаружены маркеры четырех возбудителей в следующих ассоциациях: хантавирусы серотипов Dobrava и Puumala, недифференцированные до вида риккетсии, боррелии (1 больной); лептоспиры, хантавирус серотипа Puumala, недифференцированные до вида риккетсии, боррелии (1 больной). У двух больных при серологическом обследовании подтверждено присутствие острого заболевания вследствие поражения пятью патогенами: у одного — хантавирусы серотипов Dobrava и Puumala, вирус клещевого энцефалита, лептоспиры и недифференцированные до вида риккетсии; во втором случае — хантавирусы серотипов Dobrava и Puumala, вирус клещевого энцефалита, коксиеллы и недифференцированные до вида риккетсии. У больных с сочетанными вариантами инфекционных заболеваний преимущественно развивались тяжелые формы болезни, с полиорганными и полисистемными поражениями, осложнениями и длительным периодом реконвалесценции.

Ведущим маркером циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекций на эндемических территориях является наличие иммунной прослойки среди совокупного населения к определенным патогенам. В ходе когортных исследований нами обнаружены высокие уровни серопозитивности населения к вирусному клещевому энцефалиту, иксодовому клещевому боррелиозу и геморрагической лихорадке с почечным синдромом на исследуемых территориях (рисунок).

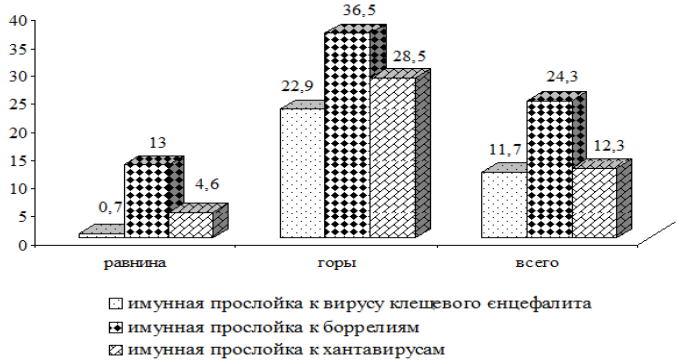



Рисунок — Иммунная прослойка совокупного населения к возбудителям природно-очаговых инфекций на западе Украины в разных ландшафтно-географических зонах

У 20 лиц ((7,5±1,6)%) в сыворотках крови, кроме антител класса G к вирусу клещевого энцефалита, одновременно выявлены антитела класса G к боррелиям.

Изучение структуры и напряженности популяционного иммунитета к хантавирусам среди здорового населения подтвердило наличие активного сочетанного очага лихорадки с почечным синдромом на исследуемых территориях. При этом было установлено циркуляцию двух серотипов хантавирусов: Dobrava и Puumala, а часть положительных проб не были идентифицированы до серотипа. По данным сероэпидемиологического мониторинга одновременно антитела к обоим серотипам хантавирусов выявлены у (6,4±0,5)% лиц, а также наблюдалась тенденция к снижению иммун-

ной прослойки населения в отношении хантавирусов от горной зоны ((17,8±0,9)%) к равнинной ((1,4±0,2)%).

Полученные результаты нашей работы подтверждают актуальность природно-очаговых зооантропонозов в регионе, что требует организации адекватного их контроля [1, 5, 6, 10]. Эффективный контроль за инфекционными болезнями возможен лишь при осуществлении корректного эпиднадзора, важными элементами которого на всех этапах является клинический, лабораторный и эпидемиологический мониторинг [5, 7, 8, 9].

**Выводы.** Таким образом, этиологическая расшифровка заболеваний людей, манифестирующих лихорадочными состояниями неясной этиологии, позволила выявить и подтвердить активную циркуляцию на западе Украины возбудителей природно-очаговых зооантропонозных заболеваний, наличие сформированных сочетанных природных очагов с высокой степенью активности. Синдромальный надзор, как базовый при природно-очаговых зооантропонозах, является эффективным при проведении госпитального блока и позволяет определить спектр актуальных патогенных биологических агентов для конкретных территорий. Изучение распространенности природно-очаговых заболеваний среди населения эндемических территорий с использованием сероэпидемиологического мониторинга, позволяет оценить структуру и определить активность сочетанных природных очагов, разработать адекватные мероприятия для снижения их эпизоото-эпидемического потенциала.

**Литература**


1. Епідемічна ситуація щодо особливо небезпечних інфекційних хвороб та заходи профілактики, проблеми, перспективи / Л.С. Некрасова [і ін.] // Актуальні проблеми особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки: матер. конф. — Євпаторія, 2012. — С. 2–7.
2. Природные очаги зоонозов в Крыму: современное состояние / М.Т. Кровякова [и др.] // Актуальні проблеми особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки: матеріали наради-семінару. — Сімферополь, 2008. — С. 97–103.
3. Вотяков, В.И. Западный клещевой энцефалит / В.И. Вотяков, В.И. Злобин, Н.П. Мишаева. — Новосибирск: Наука, 2002. — 437 с.
4. Global trends in emerging infectious diseases / K.E. Jones [et al.] // Nature. — 2008. — № 451. — P. 990–994.
5. Виноград, Н.О. Особливості епіднагляду в поєднаних осередках «кліщових» особливо небезпечних інфекцій / Н.О. Виноград, З.П. Василишин // Актуальні проблеми профілактики особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки: матер. наради-семінару. — Одеса, 2007. — С. 25–26.
6. Виноград, Н.О. Оптимизация роботы лабораторной сети в системе индикации возбудителей особо опасных инфекций / Н.О. Виноград, Л.П. Козак, З.П. Василишин // Итоги и перспективы обеспечения эпидемического благополучия населения Российской Федерации: тез. докл. IX съезда Всерос. науч.-практ. объединения эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — М., 2007. — С. 69.
7. Innovative Uses for Syndromic Surveillance / E.K. O'Connell [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2010. — Vol. 16, № 4. — P. 669.
8. Syndromic surveillance: adapting innovations to developing settings / J.P. Chretien [et al.] // PLoS Med. — 2008. — № 5. — P. 72.
9. Стандарты эпидемиологического надзора, рекомендуемые ВОЗ [Текст]. — Женева: ВОЗ, 1999. — 166 с.
10. Юрченко, О.А. Оптимизация лабораторной диагностики природно-очаговых инфекций, передающихся иксодовыми клещами / О.А. Юрченко, Д.А. Дубина, А.П. Михайлова // Актуальні проблеми особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки: матер. конф. — Євпаторія, 2012. — С. 53–56.


## PROBLEMS OF MONITORING OF THE COMBINED NATURAL FOCI


**Vynograd N.A., Vasylyshyn Z.P., Kozak L.P.**

*Danylo Halytskiy Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine*



A high epidemic potential of the combined natural foci of zooanthroponosis infections on territory of west of Ukraine was detected. A mono- and mix-infections caused agents of tick-borne encephalitis, ixodes tick-borne borreliosis, hemorrhagic fever with renal syndrome was shown ones complicate diagnostic, treatment and prognosis for patients. A high serological-reactivity levels among population for natural foci agents was reflected about active combined natural foci of several pathogens. A spectrum of region' actually extremely dangerous pathogens was indicated. Needs of modernization of the surveillance system for natural foci especial of laboratory control block was proved.



**Keywords:** combined natural foci, extremely dangerous pathogens, monitoring, mix-infections.

Поступила 04.09.2013

# КЛЕЩЕВЫЕ ТРАНСМИССИВНЫЕ ИНФЕКЦИИ В КИЕВСКОЙ ОБЛАСТИ

**Виноград Н.А.[1], Комаренко Н.С.[2]**

*[1]Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого МЗ Украины, Львов, Украина;*

*[2]Киевский областной лабораторный центр Госсанэпидслужбы Украины, Киев, Украина*

**Резюме.** Представлены результаты комплексных лабораторных исследований объектов окружающей среды биотического происхождения, проведенные с целью индикации возбудителей клещевых трансмиссивных инфекций. По данным серологических и молекулярно-генетических исследований установлена циркуляция возбудителей туляремии, иксодового клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза человека, вирусного клещевого энцефалита и коксиеллеза на территории Киевской области. Установлен видовой состав доминантных видов клещей и млекопитающих, обеспечивающих формирование и поддержание природных очагов этих клещевых трансмиссивных инфекций.

**Ключевые слова:** клещевые трансмиссивные заболевания, природные очаги, Киевская область.

**Введение.** Природно-очаговые трансмиссивные зооантропонозы, передающиеся иксодовыми клещами, являются актуальной проблемой многих стран мира, а большинство микроорганизмов из этой группы относятся к возбудителям особо опасных инфекций (ООИ) 1 или 2 групп патогенности [1]. Эта полиэтиологическая группа включает бактериальные (*Fransicella spp., Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma spp., Bartonella spp., Ehrlichia spp., Neoerhlichia mikurensis*), риккетсиозные (*Coxiella burnetii, Ricketsia spp.*), вирусные (вирусы клещевого энцефалита (ВКЭ), Крымской-Конго геморрагической лихорадки), протозойные (*Babesia spp., Theileria spp.*) патогенные биологические агенты (ПБА) [2, 3].

Климатогеографические и флорофаунистические особенности Киевской области способствуют циркуляции возбудителей трансмиссивных инфекционных заболеваний, передающихся иксодовыми клещами. В области выделяют две ландшафтные зоны: лесную (Полесье) на севере и лесостепную (Лесостепь, которую относительно р. Днепр разделяют на правый и левый берега) на юге. Вся территория области расположена в пределах умеренного климата. Крупные реки (Днепр, Десна, Россь и др.), озера, Киевское и Каневское водохранилища образуют азональные участки со своеобразной флорой и фауной [5].

Разнообразие фауны Киевской области насчитывает более 25 видов млекопитающих, около 20 видов птиц, 3 вида иксодовых клещей, видовой состав которых является оптимальным для формирования природных очагов трансмиссивных инфекций [6]. Кроме того, Киевская область расположена в пределах трансконтинентальных миграционных путей перелетных птиц (Балтика — Черное море, Север Европы — Африка и Ближний Восток) [7], что способствует заносу новых возбудителей природно-очаговых инфекций с эндемических территорий.

Контроль над циркуляцией возбудителей природно-очаговых инфекций в природных экосистемах является ключевым элементом в обеспечении защиты населения от ПБА. Прогресс в области микробиологии привел к созданию новых методов выявления ПБА, что позволило нам провести изучение природных очагов с целью выявления циркуляции ранее известных и новых возбудителей с использованием комплекса серологических и молекулярно-генетических методов.

**Цель.** Изучение спектра циркулирующих возбудителей трансмиссивных зооантропонозов, передающихся иксодовыми клещами, в различных ландшафтных регионах Киевской области, а также видового состава их переносчиков и животных-резервуаров.

**Материалы и методы.** Исследования проводили согласно принятым в стране регламентам биобезопасности по недопущению инфицирования оператора и распространения ПБА в окружающей среде на всех этапах отбора, транспортировки и проведения исследования образцов биотических объектов [8, 9].

Исследовались объекты окружающей среды (ООС): иксодовые клещи, мелкие млекопитающие и погадки, собранные на территории Киевской области. Отлов мелких млекопитающих осуществляли по общепринятой методике с использованием ловушек Геро [10]. Сбор имаго иксодовых

клещей и определение их численности на поверхности земли проводили на фланелевый флаг маршрутным методом, а также проводили сбор клещей с животных (крупный и мелкий рогатый скот, кошки, собаки). Видовую идентификацию клещей и мелких млекопитающих проводили перед группированием их в пробы (пулы).

В работе использованы серологические и молекулярно-генетические методы. Выделение нуклеиновых кислот возбудителей трансмиссивных клещевых инфекционных заболеваний проводили наборами «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ) и «РИБО-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, РФ) в соответствии с инструкцией.

**Детекция *F. tularensis*.** Антигены (АГ) *F. tularensis* определяли в суспензиях клещей, органах мышевидных грызунов и насекомоядных, погадках хищных птиц с использованием реагентов: «Диагностикум туляремийный иммуноглобулиновый полимерний для РАО сухой» (ФКУЗ Ростовский-на-Дону НИПЧИ Роспторебнадзора (Ростов-на-Дону, РФ); «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» — диагностикум эритроцитарный туляремийный жидкий (ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора, Ставрополь, РФ).

Исследование суспензий иксодовых клещей на туляремию проводились методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с параллельным использованием комплектов реагентов «Fransicella tularensis Target 1» и «Fransicella tularensis Target 2» (Idaho Technology Inc., USA); «Eva Green», (МИИ СВ США им. Уолтера Рида, США). Амплификация и детекция осуществлялись с использованием термоциклера «RotorGene Q» (Corbett Research, Австралия). Выделение ДНК из проб для исследования на туляремию проводилось набором реагентов «UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation Kit» (Mo Bio Laboratories Inc., USA).

**Детекция *Borrelia burgdorferi sensu lato*.** Специфические генетические последовательности *Borrelia burgdorferi sensu lato* определяли методом ПЦР-РВ с использованием комплектов реагентов «АмплиСенс Borrelia burgdorferi sensu lato-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, РФ), «РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s.l. (комплект 2 / RG)» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ).

Определение геновидов боррелий *B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii* проводили ПЦР-методом электрофореза с детекцией в 1,5% агарозном геле с использованием наборов реагентов «GenPak DNA PCR test»: «B. burgdorferi», «B. garinii», «B. afzelii» («Лаборатория Изоген», Москва, РФ). Амплификацию проводили в термостате для ПЦР-анализа «Palm Cycler» (Corbett Research, Австралия). Детекцию продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле в камере для горизонтального электрофореза SE-2 (Хеликон, РФ). Окрашенный бромистым этидием гель просматривали под ультрафиолетовым излучением с длинной волны 312 нм. Регистрацию результатов осуществляли фотографированием.

**Детекция *Coxiella burnetii*.** Обнаружение АГ *C. burnetii* проводили с использованием ИФА-тест-системы «ИФА-Ку-антиген» (ФГУН НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, РФ).

Для определения ДНК *C. burnetii* использовали набор реагентов «АмплиСенс Coxiella burnetii-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, РФ). Для обнаружения ДНК *Anaplasma phagocytophilum* и *Ehrlichia sp.* (*E. muris, E. chaffeensis*) использовали комплект реагентов «РеалБест ДНК Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis (комплект 2/RG)» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ). Амплификацию и детекцию при ПЦР с использованием указанных тест-систем проводили в термоциклере «RotorGene 6000» (Corbett Research, Австралия).

**Детекция ВКЭ.** Для определения АГ ВКЭ использовали ИФА тест-систему «ВектоВКЭ – антиген» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, РФ).

По результатам исследований ООС биотического происхождения рассчитывали показатель вирусофорности, процент положительных проб клещей и мелких млекопитающих (%), относительный показатель инфицированности мелких млекопитающих (%).

Статистическую обработку результатов проводили по стандартной методике определения доверительного интервала и критерия Стьюдента на ПК с помощью программы «Statistica 6.0».

**Результаты и их обсуждение.** Многолетние эпизоотологические исследования показали, что из 10 встречающихся видов мелких млекопитающих доминантными являются четыре вида: мышь домовая (*Mus musculus*), мышь полевая (*Apodemus agrarius*), мышь лесная (*Apodemus sylvaticus*) и полевка обыкновенная (*Microtus arvalis*). Остальные шесть видов относятся к группе обычных видов: мышь желтогорлая (*Apodemus flavicollis*), мышь малютка (*Micromys minutus*), полевка ры-

жая (*Clethrionomys glareolus*), бурозубка малая (*Sorex minutus*); из редких видов — белозубка малая (*Crocidura suaveolens*), соня лесная (*Dryomys nitedula*).

Фауна иксодид в области представлена клещами 3-х видов: доминантным — *Dermecenor reticulatus*, субдоминантным — *Ixodes ricinus*, редким — *Dermacenter marginatus*. До начала наших исследований по изучению природных очагов трансмиссивных зооантропонозов Киевская область считалась благополучной по большинству трансмиссивных инфекций, которые переносятся иксодовыми клещами. Из всего разнообразия этих инфекций было известно только о существовании природных очагов туляремии и ВКЭ. Изучение полевого материала на туляремию до начала наших исследований проводились исключительно классическими методами (биологическим и бактериологическим).

При исследовании на туляремию методом РАО 591 пула клещей (7896 экземпляров) АГ *F. ularensis* был выявлен в (16,92±0,35)% проб, при этом относительный показатель инфицированности составил (1,27±0,002)%. При исследовании клещей, собранных с животных, туляремийный антиген выявлен в пробах эктопаразитов, снятых с крупного рогатого скота — в клещах всех видов, собак — *I. ricinus* і *D. reticulatus*. При этом установлено, что зараженность клещей *D. reticulatus F. tularensis* в зоне Лесостепи была достоверно выше, чем в зоне Полесья ($p< 0,05$).

Исследование в РАО 281 образца суспензий внутренних органов мелких млекопитающих позволило выявить туляремийный АГ в 7 пробах, или в (2,49±0,04)% случаев, при этом показатель инфицированности составил (2,33±0,03)%.

При исследовании в РАО 778 погадок хищных птиц, объединенных в 185 проб, выявлено АГ возбудителя туляремии в 101 пробе, или в (54,6±2,95)% случаев, показатель инфицированности составил (12,98±0,21)%. Титры в положительных пробах погадок хищных птиц в РАО колебались в пределах 1:20–1:80.

Исходя из результатов исследований суспензий клещей, органов мелких грызунов, погадок хищных птиц, территория области продолжает оставаться энзоотичной по туляремии.

Наиболее актуальной клещевой зооантропонозной инфекцией в период проведения наших исследований являлся ИКБ, о чем свидетельствует стремительный рост количества энзоотических территорий и показателей заболеваемости населения, последний более чем в 10 раз.

Исследование 4791 экземпляра (экз.) иксодовых клещей, объединенных в 567 проб, направленное на выявление специфических генетических последовательностей боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, показали, что генетические маркеры данного возбудителя присутствовали в 93 пробах, или в (16,4±0,34)% случаев; минимальный уровень инфицированности эктопаразитов составил (1,94±0,01)%.

В результате типирования 54 проб клещей в ПЦР-методом электрофореза с детекцией в агарозном геле геновиды боррелий удалось определить в 28 пробах ((51,85±8,01)%). При этом в 24 пробах ((85,72±12,68)%) выявлены генетические маркеры *B. afzelii*, в 2 пробах ((7,14±0,6)%) — *B. garinii* и в 2 пулах ((7,14±0,6)%) — микст *B. afzelii* и *B. garinii*. Таким образом, выявлена циркуляция *B. afzelii* и *B. garinii* как в моно-, так и микст-инфекции. Доминирующим геновидом боррелий на территории Киевской области был *B. afzelii*.

Основным вектором боррелий были клещи *I. ricinus* со средним показателем боррелиофорности (3,91±0,01)% согласно результатам исследований методом ПЦР-РВ. При этом в зоне Полесья боррелиофорность в 1,9 раза превышала аналогичный показатель в зоне Лесостепи (6,61 ±0,01) против (3,54 ±0,04)%.

Исследования Киевской области на предмет энзоотичности по Ку-лихорадке, начатые нами в 2009 г., позволили впервые выявить природные очаги этой инфекции.

При исследовании в ИФА 8446 экземпляров клещей, объединенных в 467 пулов, на наличие АГ *C. burnetii* маркеры возбудителя коксиеллезной инфекции обнаружены в 18 пулах ((3,85±0,05)%), а минимальный уровень инфицированности клещей составил (0,21±0,0002)%. Параллельно в ИФА и ПЦР-РВ проведено исследование 26 проб клещей. Наличие АГ *C. burnetii* подтверждено в 8 ((30,77±4,39)%) пробах, тогда как специфические последовательности ДНК обнаружены в 2 пробах ((25,0±7,15)%). Всего методом ПЦР-РВ исследовано 499 экземпляров клещей, объединенных в 71 пробу, при этом ДНК C. burnetii обнаружена в (2,82±0,1)%.

В зоне Полесья основным вектором *C. burnetii* были *I. ricinus* ((24,46±5,03)% исследованных проб), а в зоне Лесостепи — *D. reticulatus* — (5,1±0,12)%. В пулах *D. marginatus* АГ *C. burnetii* не выявлен. Показатели минимальной инфицированности клещей *D. reticulatus* возбудителем коксиел-

леза варьировали в пределах 0,11–0,58%, *I. ricinus* — 0,2–0,46%, а в среднем по области составляла (0,24±0,0002)%. Выявление АГ *C. burnetii* в клещах, собранных с сельскохозяйственных животных, собак и кошек, подтверждают формирование очагов антропургического типа.

При исследовании *C. burnetii* 46 проб легких, отобранных от 110 экземпляров мелких млекопитающих, и 85 проб селезенок от 142 зверьков на наличие АГ, последний обнаружен не был.

Проблема ВКЭ изучалась в области с 1955 г., когда впервые была показана циркуляция вируса ВКЭ [10]. Нами обследовано 5307 экземпляров иксодовых клещей на наличие АГ ВКЭ, объединенных в 298 пулов. В ((26,17±0,91)%) исследованных проб выявлен АГ ВКЭ. Показатель вирусофорности при этом составил ((1,47±0,02)%). В результате исследования суспензий головного мозга 268 экземпляров мелких млекопитающих, объединенных в 156 проб, АГ ВКЭ выявлен в 19 пробах ((12,18±0,45)%). Относительный показатель инфицированности грызунов вирусом клещевого энцефалита составил ((7,09 ± 0,16)%).

Основным вектором ВКЭ во всех ландшафтно-географических зонах является I. ricinus со средним показателем вирусофорности по области ((2,36±0,02)%). Антиген ВКЭ определяли в клещах, снятых с крупного и мелкого рогатого скота, собак, кошек, а также собранных на флаг. При исследовании мозга мелких грызунов положительные находки обнаружены у грызунов 3 видов: *Mus musculus, Apodemus agrarius, Micromys minutus*.

На следующем этапе мы провели исследования методом ПЦР-РВ на наличие специфических последовательностей ДНК *A. phagocytophilum* и *Ehrlichia sp.* (*E. muris, E. chaffeensis*) 110 пулов клещей (690 экземпляров). Специфические генетические последовательности возбудителя ГАЧ обнаружены в 22 пробах ((20,0±1,08)%) с показателем инфицированности — ((3,19±0,03)%), а генетические маркеры МЭЧ — в 1 пробе ((0,91±0,002)%) с показателем инфицированности — ((0,15±0,0004)%).

Таким образом, исследования иксодовых клещей на наличие специфических фрагментов ДНК возбудителей ГАЧ и МЭЧ методом ПЦР-РВ позволило впервые доказать их циркуляцию на территории Киевской области. Исходя из полученных результатов, можно предположить существование активного природного очага ГАЧ на территории области.

**Выводы.** 1. Киевская область является эндемичной территорией по иксодовому клещевому боррелиозу, Ку-лихорадке, туляремии, вирусному клещевому энцефалиту, гранулоцитарному анаплазмозу человека, моноцитарному эрлихиозу человека.

2. Функционирование природных очагов клещевых трансмиссивных инфекций обеспечивают 10 доминантных видов мелких млекопитающих и 3 вида иксодид.

3. Для определения пространственных характеристик и напряженности природных очагов трансмиссивных зооантропонозов необходимо проведение дополнительных эпизоотоэпидемиологических и лабораторных исследований.

Авторы статьи выражают благодарность специалистам лаборатории ООИ ГУ «ЦСЭС МОЗ Украины»: заведующей лабораторией Выдайко Н.Б., бактериологу Билоник О.И. за оказанную помощь в проведении исследований методом ПЦР на туляремию; специалистам лаборатории эпигенетики ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины»: руководителю лаборатории, д-ру мед. наук Вайсерману А.М., мл. науч. сотр. Коляде А.К. за предоставленную возможность проведения исследований с использованием ПЦР методом электрофореза с детекцией в агарозном геле и помощь в выполнении данных исследований; коллективу лаборатории ООИ отдела исследований биологических факторов ГУ «Киевский областной лабораторный центр Госсанэпидслужбы Украины» биологу Могильной Л.А., фельдшерам-лаборантам Кучеренко С.В., Гузырь И.Ю., Слипченко А.С. за помощь в проведении исследований.

**Литература**

1. Онищенко, Г.Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое пособие / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев. — М.: Медицина, Шико, 2009. — 472 с.

2. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe / P. Heyman [et al.] // Exp. Rev. Anti Infect. Ther. — 2010. — № 8. — P. 33–50. — Available: http://dx.doi.org/10.1586/eri.09.118.

3. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens / C. Reis [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. — 2011. — № 11. — P. 907–916. — Available: http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2010.0103.

4. Лівійський, В.М. Клімат України / В.М. Лівійський, В.А. Дячук, В.М. Бабіченко. — Київ: Вид-во Раєвського, 2003. — 343 с.

5. Збудники природно-осередкових інфекцій в екосистемах Півдня України / І.В. Наконечний, В.В. Серебряков. — Київ: Тофи Киме, 2012. — 226 с.
6. Серебряков, В.В. Екологічні закономірності міграції птахів фауни України в часі та просторі: автореф. дис. … д-ра біол. наук: спец. 03.00.16 «Екологія» / В.В. Серебряков. — Київ, 2002. — 21 с.
7. ДСанПіН 9.9.5-153-2008 «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти молекулярно-генетичними методами». — Київ. — 2008. — 52 с.
8. ДСП 9.9.035-99 «Безпека роботи з мікроорганізмами І-ІІ груп патогенності».
9. Петрищева, П.А. Методы изучения природных очагов болезней человека / П.А. Петрищева, Н.Г. Олсуфьева. — М.: Медицина, 1964. — 308 с.
10. Васильева, В.Л. Материалы к изучению арбовирусных инфекций в Полесье УССР / В.Л. Васильева // Проблемы нейровирусных инфекций. — Київ: Здоров'я, 1965. — С. 132–133.

## TICK-BORNE TRANSMISSIBLE INFECTIONS IN KIEV REGION

**Vynograd N.A.[1], Komarenko N.S.[2]**

*[1]Danylo Halytskiy Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine*

*[2]State Establishment «Kyiv Regional Laboratory Center of State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine», Kyiv, Ukraine*

The results of complex laboratory studies of the biotic origin environment objects were carried out in order to display tick-borne pathogens infections is presented. According to the serological and molecular genetic studies the circulation in Kyiv region of the agents of tularemia, Ixodes tick-borne Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, tick-borne encephalitis virus and coxiellosis had been found out. The data on species composition of the ticks and mammals dominant species, ensuring the formation and maintenance of tick-borne infections natural foci had been established.

**Keywords:** tick-borne diseases, natural foci, Kiev region.

Поступила 04.09.2013

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГОСПИТАЛЬНОГО НАДЗОРА ЗА КОКСИЕЛЛЕЗОМ

**Виноград Н.А., Скальская Н.И.**

*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого МЗ Украины, Львов, Украина;*

**Резюме.** Представлены результаты исследований, проведенные с целью изучения заболеваемости населения коксиеллезом в западном регионе Украины, с использованием стандартов госпитального надзора ВОЗ. При обследовании в иммуноферментном анализе парных сывороток крови 672 больных IgM к *Coxiella burnetii* обнаружены у 62 ((9,2±1,1)%) пациента. Определены основные клинико-эпидемиологические характеристики больных коксиеллезом. Установлены отличия в показателях заболеваемости населения коксиеллезом в различных ландшафтно-географических и климатических зонах.

**Ключевые слова:** коксиеллез, заболеваемость, госпитальный надзор.

**Введение.** Коксиеллез (Ку-лихорадка, МКБ-Х — А78) относится к группе зооантропонозных инфекционных заболеваний с множественными механизмами передачи возбудителя, который имеет планетарное распространение. По данным экспертов европейского Центра контроля заболеваний, уровень серопозитивности населения в странах Европейского союза в последние десятилетия колеблется в пределах 2–14% совокупного населения, а среди жителей сельской местности этот показатель достигает 10–30% [1, 2].

Паразитарная система при коксиеллезе, обеспечивающая сохранение возбудителя *Coxiella burnetii* как биологического вида, включает многочисленные виды диких и домашних животных, птиц, клещей, которые служат источником возбудителя для человека. Наиболее существенное значение в этом плане имеют домашние животные и, прежде всего, мелкий и крупный рогатый скот [3, 4]. Несмотря на высокий уровень зараженности клещей *C. burnetii*, трансмиссивная передача возбудителя к человеку не доказана окончательно, тогда как основным считается воздушный механизм

передачи, установленным фактом — вертикальная передача возбудителя от матери к плоду, а также возможно заражение при грудном кормлении ребенка, при половых контактах, трансплантации [5, 6].

Преимущественно острый коксиеллез манифестирует тремя клиническими формами: гриппоподобным лихорадящим заболеванием, пневмонией (Северная Америка) и гепатитом (Европа). В первом случае длительность заболевания составляет 5–14 дней, сопровождается гиперэргичной реакцией с острым началом, выраженной головной болью, миалгиями, ознобом, усталостью и гипергидрозом. Пневмонии чаще выявляются физикальными или инструментальными методами, имеют мягкое течение, однако в ряде случаев заканчиваются острым респираторным дистресс-синдромом. Гепатиты с длительностью заболевания 2–3 нед. сопровождаются незначительными за интенсивностью, типичными для гепатита симптомами, в т. ч. изменениями параклинических параметров. Для хронической формы болезни более характерно развитие эндокардита [3, 4].

Сложной является не только клиническая диагностика коксиеллеза, но и верификация диагноза с использованием комплекса лабораторных методов. Полимеразная цепная реакция используется только для диагностики острого коксиеллеза в первые две недели болезни до назначения антибиотиков. Золотым стандартом верификации является серологический метод — иммуноферментный анализ, реакция связывания комплемента, реакция непрямой микроиммунофлюоресценции (по результатам сероконверсии или обнаружение IgM в единичной сыворотке крови). Остальные методы (иммуногистохимический, бактериологический) используются больше при проведении научных исследований в специализированных лабораториях. При хронической инфекции диагностический титр IgG в иммуноферментном анализе составляет ≥1:1024 [2].

Объективным показателем эпизоотолого-эпидемического неблагополучия по коксиеллезу во многих странах мира является высокий уровень серопозитивности среди домашних животных [7, 8]. Подтверждением тому послужил и эпидемический подъем заболеваемости коксиеллезом в 2007–2010 гг. в Нидерландах, где было зарегистрировано более 4 тыс. случаев заболеваний среди людей, из них 14 завершились летальным исходом [9]. В последние годы предложены стандарты определения случая заболевания коксиеллезом в США и странах ЕС, что позволило оптимизировать клиническую, лабораторную и эпидемиологическую диагностику этого заболевания.

Проблема коксиеллеза изучается в нашей стране с 1952 г. Энзоотическими территориями по коксиеллезу среди животных преимущественно являются области с развитым животноводством, где регистрируются спорадические случаи заболеваний людей [10].

**Цель:** изучение клинико-эпидемиологические характеристики коксиеллеза у госпитализированных больных с лихорадящими заболеваниями невыясненной этиологии в трех различных климатогеографических районах: горы (район «Г»), Полесье (район «П»), предгорная территория (район «ПГ»).

**Материалы и методы.** В течение трех лет проводились целенаправленные исследования по изучению структуры инфекционной заболеваемости населения западного региона Украины. Все этапы работы выполнялись в соответствии с требованиями биоэтики. Для установления роли коксиелл в формировании краевой инфекционной патологии проведено обследование парных сывороток крови 672 больных в иммуноферментном анализе на наличие IgM к *C. burnetii* (PanBio, Australia). Забор первой сыворотки крови проводился в момент госпитализации пациента, а второй — через две недели или в момент выписки из стационара, если это было раньше указанного срока. Сбор клинической и эпидемиологической базы данных был выполнен с использованием открытых анкет, информация систематизирована и проанализирована в Exel 06. Статистическая обработка проведена на персональном компьютере с помощью программы «Statistica 6.0».

**Результаты и их обсуждение.** Приступая к проведению исследований, мы разработали расширенный вариант определения случая заболевания, вызванного возбудителем особо опасной болезни, с учетом возникающей при этом полиорганной и полисистемной патологии, т. к. к тому времени отсутствовали национальные стандарты определения случая коксиеллеза. В нашем исследовании принимали участие больные, госпитализированные в инфекционные стационары с лихорадящими заболеваниями невыясненной этиологии, у которых наблюдались следующие синдромальные комплексы: респираторный, острого гепатита, интестинальный, неврологический, геморрагический, нефрологический, поражение опорно-двигательного аппарата. При этом мы использовали стандарты ВОЗ как базовые для заболеваний, вызванных возбудителями особо опасных инфекций, так как к моменту проведения наших исследований отсутствовали национальные стандарты.

Проведенные серологические исследования показали, что все три района были эндемичными в отношении коксиеллеза, два из них ранее считались свободными от него. Антитела класса IgM к *C. burnetii* определялись у 48 ((13,8±1,8)%) больных в районе «Г», у 10 ((5,1±1,6)%) пациентов в районе «П», у 4 ((3,1±1,5)%) — в районе «ПГ».

Анализ результатов обследования в районе «Г» в динамике показал, что случаи заражения людей *C. burnetii* имели место постоянно из года в год. Так, в первый год исследований было выявлено 17 ((16,1±3,5)%) сероположительных больных от общего числа обследованных, на следующий год — 23 ((17,4±3,3)%), затем — 8 ((7,3±2,4)%) больных коксиеллезом. Средний возраст пациентов составил 25,5 (2–59) года. Не было установлено среди заболевших статистически достоверной разницы в распределении по полу, тогда как в течение всего времени наблюдения среди них преобладали жители сельской местности (64,6±6,9%).

Анализ клинических диагнозов и динамики болезни показал широкий полиморфизм манифестации коксиеллеза. Доминирующим из синдромов был респираторный, который возникал у большинства больных одновременно с подъемом температуры тела ≥38,5°С. Диагноз «Острое респираторное заболевание» был поставлен 14 больным, а у 2 пациентов при этом также наблюдались признаки поражения кожи в виде эритемы. Двое больных были госпитализированы с симптомами поражения опорно-двигательного аппарата, 10 больных — с поражениями центральной нервной системы, 3 — с поражением почек и 8 — печени. Еще у 9 больных наблюдалось поражение желудочно-кишечного тракта. При этом симптом гепатита возник в дебюте болезни у 2 больных, а поражение желудочно-кишечного тракта — у 3 больных.

Спорадические случаи заболеваний коксиеллезом в районе «П» также наблюдались ежегодно: 4 ((4,5±2,2)%); 5 ((6,6±2,8) ) и 1 случаи в течение трех лет наблюдений. Средний возраст пациентов был близок к таковому в предыдущей группе и составил 25,9 года, но болели лишь подростки и люди активного трудоспособного возраста (14–49 лет). Одинаково часто болели мужчины и женщины, а среди заболевших преобладали городские жители.

Заболевание возникало остро и манифестировало у большинства поражением респираторного тракта (7) и лишь трое больных были госпитализированы с иными диагнозами: «Инфекционный мононуклеоз» (1), «Острый энтероколит» (1), «Острый пиелоцистит» (1).

Все четыре случая заболевания людей коксиеллезом в районе «ПГ» были выявлены только в течение одного года. Заболевания манифестировали респираторным синдромом, на фоне которого присоединялись признаки поражения центральной нервной системы. Возраст больных колебался от 15 до 52 лет и составил в среднем 30 лет. Трое из заболевших были лицами мужского пола и все больные — городские жители. Можно предположить, что преобладание городских жителей больше свидетельствует о доступности их к оказанию корректной медицинской помощи.

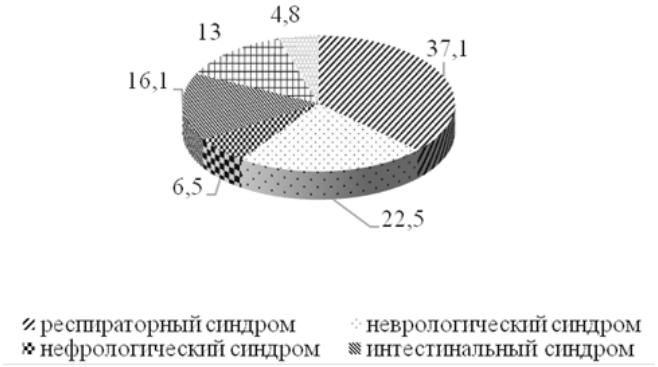



Рисунок — Структура синдромальных комплексов у больных коксиеллезом

Анализируя данные эпидемиологического анамнеза, мы обнаружили у всех заболевших множество факторов, которые могли бы способствовать инфицированию этих людей. По нашему мнению, необходимо проведение углубленных эпидемиологических исследований для определения факторов риска с учетом реальной эпизоотической ситуации. По официальным данным, случаев инфицирования животных *C. burnetii* в период проведения наших исследований на этих территориях не обнаруживалось.

**Выводы.** Таким образом, территория западной Украины является эндемичной по коксиеллезу, о чем свидетельствую случаи заболевания населения. Группой риска заражения являются преимущественно подростки и лица активного трудоспособного возраста; проживающие как в сельской местности, так и в городах люди. Отсутствие настороженности медицинских работников, полиморфизм клинической картины болезни, несостоятельность лабораторной службы в части верификации диагноза снижают эффективность системы контроля и мониторинга коксиеллеза. Для эффективного эпидемиологического надзора необходимо разработать национальные стандарты. Целесообразно использовать разработанные ВОЗ подходы по определению стандарта случая заболевания при создании аналогичных национальных. Важным направлением должны быть комплексные межведомственные планы по борьбе с этими заболеваниями как среди людей, так и животных.

**Литература**


1. Wagner-Wiening, C. Serological diagnosis and follow-up of asymptomatic and acute Q fever infections / C. Wagner-Wiening, S. Brockmann, P. Kimmig // Int. J. Med. Microbiol. — 2006. — Vol. 296, № 40. — P. 294–296.
2. Q fever: Epidemiology, diagnosis, and treatment / J.D. Hartzell [et al.] // Mayo Clin. Proc. — 2008. — Vol. 83, № 5. — P. 574–579.
3. Raoult, D. Natural history and pathophysiology of Q fever / D. Raoult, T. Marrie, J. Mege // Lancet Infect. Dis. — 2005. — Vol. 5. — P. 219–226.
4. Parker, N.R. Q fever / N.R. Parker, J.H. Barralet, A.M. Bell // Lancet. — 2006. — Vol. 367. — P. 679–688.
5. Raoult, D. Q fever during pregnancy, a risk for women, fetuses and obstetricians / D. Raoult, A. Stein // N. Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 330, № 5. — P. 371.
6. Sexually transmitted Q fever / A. Milazzo [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 33, № 3. — P. 399–402.
7. Prevalence of Coxiella burnetii antibodies in Danish dairy herds / J.F. Agger [et al.] // Acta Vet. Scand. — 2010. — Vol. 52, № 5. — P. 1–4.
8. Martinov, S.P. Studies on some biological, morphological and immunological properties of Coxiella burnetii, the state and the peculiarities of the natural and the agricultural foci of Q fever in Bulgaria: D. Sc. Dissertation / S.P. Martinov. — Sofia, 2006. – 522 p.
9. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection / H.I. Roest [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2011. — Vol. 139, № 1. — P. 1–12.
10. Епідемічна ситуація щодо особливо небезпечних інфекційних хвороб та заходи профілактики, проблеми, перспективи / Л.С. Некрасова [та ін.] // Актуальні проблеми особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки: матер. конф. — Євпаторія, 2012. — С. 2–7.


## EFFECTIVENESS OF HOSPITAL SURVEILLANCE FOR COXIELLOSIS


**Vynograd N.A., Skalska N.I.**

*Danylo Halytskiy Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine*



The results of studies of the coxiellosis morbidity in the western region of Ukraine by using the WHO standards of hospital surveillance had been conducted. On ELISA examination with IgM to *Coxiella burnetii* of paired acute and convalescent specimens from 672 patients in 62 ((9.2±1.1)%) patient had been detected. The main clinical and epidemiological features of the patients with coxiellosis had been described. The differences in rates of coxiellosis morbidity in a variety of landscape and geographical and climatic zones had been shown.



**Keywords:** coxiellosis, morbidity, hospital surveillance.

Поступила 04.09.2013


## РОТАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И СИСТЕМА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА В Г. МИНСКЕ


**Глинская И.Н.[1], Виринская А.С.[2], Дашкевич А.М.[2], Новацкая Ю.В.[2], Светогор Т.Н.[2], Гудков В.Г.[2]**

*[1]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии;*

*[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*



**Резюме.** Проведен эпидемиологический анализ заболеваемости ротавирусной инфекцией (РВИ) в г. Минске. Эпидемиологическая ситуация в целом характеризуется стабильностью, при

этом отмечаются циклические (сезонные и годовые) колебания уровня заболеваемости преимущественно детского, главным образом в возрасте до двух лет, населения. Усовершенствованная система эпидемиологического надзора за РВИ предусматривает осуществление популяционного и дозорного эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики РВИ, проведение молекулярно-эпидемиологического и серологического мониторинга, использование информационных технологий, разработку противоэпидемических мероприятий и оценку ее эффективности.

**Ключевые слова:** ротавирусная инфекция, эпидемиологическая ситуация, эпидемиологический надзор.

**Введение.** Острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают одну из лидирующих позиций в структуре инфекционных заболеваний во всем мире, включая Республику Беларусь. В 2012 г. в Республике Беларусь ОКИ по обусловленному ими уровню заболеваемости населения занимали 4-е место после острых респираторных инфекций, ветряной оспы и энтеробиоза. Подобная ситуация наблюдается и в регионах республики.

В г. Минске ежегодно регистрируется около 4–5 тыс. случаев ОКИ. При этом в последние годы значительно сократилось количество случаев заболеваний населения бактериальными инфекциями и их доля в общей структуре верифицированных ОКИ. Считается, что образовавшуюся экологическую нишу заполняют вирусные кишечные инфекции, возбудители которых высоко резистентны во внешней среде и способны реализовываться через разнообразные пути заражения и факторы передачи инфекции [1]. Наиболее значимой среди ОКИ вирусной природы является ротавирусная инфекция (РВИ), поражающая преимущественно детей. По данным ВОЗ, уровень заболеваемости РВИ колеблется в различных странах от 250 до 3000 на 100 тыс. детей [1]. Она занимает ведущее место в структуре ОКИ, что обусловлено высокой контагиозностью, устойчивостью и генетическим разнообразием возбудителя, огромным количеством экскретируемого вируса, продолжительным периодом экскреции, двойным (фекально-оральным и аэрогенным) механизмом заражения, естественной восприимчивостью населения и нестойким иммунитетом, повторными случаями заболевания и слабым влиянием уровня экономического и санитарно-гигиенического благополучия населения на интенсивность эпидемического процесса.

Вирус обнаруживается в испражнениях заболевших лиц примерно за 2-е сут до первых признаков заболевания, максимум экскреции возбудителя отмечается в первые 3–6 дней от начала болезни, а его титр достигает 12–14 lg вирусных частиц в грамме фекалий. Вместе с тем инфицирующая доза вируса, вызывающая симптомы гастроэнтерита, составляет всего около 2–4 lg [2], что создает реальный риск инфицирования при контакте с источником инфекции в 8–50% случаев.

Эпидемический характер распространения и высокая социально-экономическая значимость РВИ обусловили необходимость совершенствования системы эпидемиологического надзора за ней, содержание, структура, функции и порядок использования которой содержится в инструктивно-методических документах, утвержденных в Республике Беларусь в последние годы [3, 4].

**Цель:** охарактеризовать эпидемиологическую ситуацию в отношении РВИ в г. Минске, определить основные направления эпидемиологического надзора и организации противоэпидемических мероприятий на основе усовершенствованной системы эпидемиологического надзора за этой инфекцией.

**Материал и методы.** Использовались эпидемиологические, лабораторные, статистические методы исследования, а также оборудование и материалы, соответствующие виду проводимого исследования согласно инструкции [3].

**Результаты и их обсуждение.** Диагноз РВИ в г. Минске устанавливается на основании лабораторной верификации, как правило, путем обнаружения в фекалиях пациентов с клинической картиной ОКИ антигенов ротавирусов.

Характер эпидемического процесса РВИ в г. Минске в многолетней динамике отражен на рисунке 1. Как видно, многолетняя динамика заболеваемости РВИ на территории г. Минска (на протяжении 2001–2012 гг.) характеризуется умеренным ростом (темп прироста +4,89%) и периодичностью фаз подъема и спада заболеваемости в 1–2 года. Период 2010 и 2011 гг., в которые регистрировался повышенный уровень заболеваемости и фаза ее подъема, являлся периодом относительного эпидемиологического неблагополучия.

Рисунок 1 — Многолетняя динамика заболеваемости РВИ населения г. Минска в 2001–2012 гг. (на 100 тыс. населения)

В 2012 г., напротив, отмечалось снижение уровня заболеваемости РВИ, что характеризовало наступление фазы снижения интенсивности эпидемического процесса.

Прогнозируемый уровень заболеваемости РВИ в г. Минске на 2013 г. при сохранении выявленных тенденций определяется в диапазоне между средним и максимальным прогнозируемым уровнем от 123 до 128,2 на 100 тыс. населения. За 8 мес. 2013 г. зарегистрированный уровень заболеваемости РВИ составил 75% от среднего прогнозируемого уровня — 92,73 на 100 тыс. населения.

В возрастной структуре пациентов с РВИ на протяжении ряда лет отмечаются лишь незначительные колебания. Так, например, в 2011 г. в возрастной структуре заболевших РВИ лиц удельный вес детей в возрасте от 0 до 17 лет составил 99,4%, а в 2012 г. этот показатель был равен 97,5%. Это свидетельствует о возможности большего вовлечения в эпидемический процесс РВИ взрослого контингента населения и необходимости учета этого аспекта при проведении эпидемиологического надзора.

Среди детского населения группами риска в последние 2 года по-прежнему являлись дети в возрасте от 0 до 2 лет, которые заболевали примерно в 3,6–3,7 раза чаще, чем совокупное детское население. Так, показатель заболеваемости в этой младшей возрастной группе в 2011 г. достигал 3109 на 100 тыс. контингента, а в 2012 г. составил 1442,2 на 100 тыс. контингента. В то же время показатель заболеваемости совокупного детского населения г. Минска в 2011 и 2012 гг. составлял 830 и 396 случаев на 100 тыс. детей соответственно.

Как известно, эпидемический процесс РВИ имеет выраженную сезонность, характеризующуюся нарицательным названием этого заболевания — «зимний грипп».

Фактическая годовая динамика заболеваемости населения г. Минска РВИ за 8 мес. 2013 г. в сопоставлении с аналогичными данными за эпидемиологически благополучные и неблагополучные годы, соответствующими среднемноголетними показателями приводятся на рисунке 2.

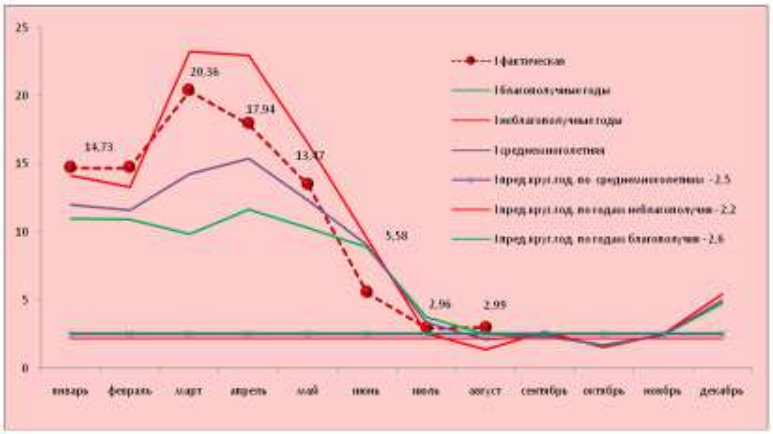



Рисунок 2 — Фактическая годовая динамика заболеваемости РВИ населения г. Минска за 8 мес. 2013 г. в сопоставлении с многолетними показателями (на 100 тыс. населения)

Как следует из приведенных на рисунке 2 графиков динамики годовой заболеваемости сезонность эпидемического процесса РВИ в целом сохраняет свой характер на протяжении ряда лет. Наблюдаются лишь определенные количественные отклонения в сроках и уровнях сезонных колебаний заболеваемости, обусловленных, главным образом, интенсивностью эпидемического процесса в различные годы. Сезонный подъем 2012–2013 гг. начался в декабре 2012 г. и завершился в июле 2013 г. Интенсивность этого подъема была выше аналогичных средних показателей за эпидемиологически благополучные годы и среднемноголетний период, но ниже уровня этих показателей за эпидемиологически неблагополучный период.

Сравнительная характеристика динамики и интенсивности сезонных подъемов заболеваемости РВИ населения г. Минска в 2011–2012 и 2012–2013 гг. приведена на рисунке 3.

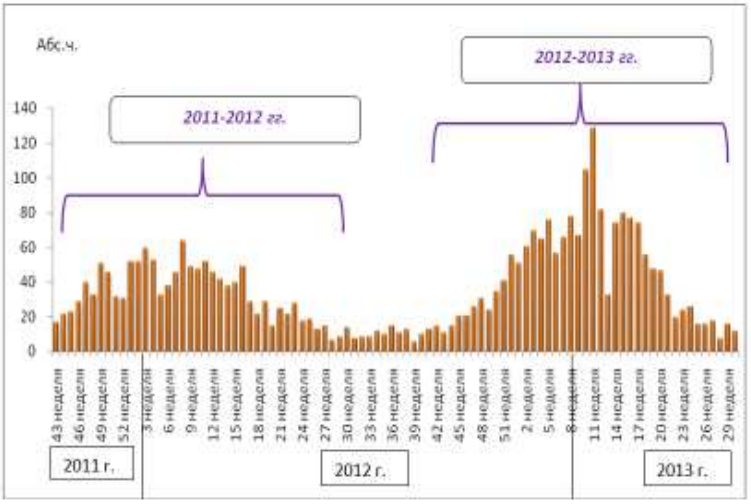



Рисунок 3 — Понедельная динамика заболеваемости РВИ населения г. Минска в 2011–2012 и 2012–2013 гг. по датам заболевания и окончательным диагнозам (абс. числа)

Интенсивность сезонного подъема в 2012–2013 гг. была в 1,6 раза выше, чем в 2011–2012 гг. Эпидемиологическая ситуация оценивалась как неустойчивая, заболеваемость находилась в диапазоне между средним и максимальным многолетним уровнем. Интенсивность сезонных подъемов заболеваемости, по-видимому, не имеет жесткой связи со сроками их начала и продолжительностью. Так, начало сезонных подъемов РВИ 2011–2012 и 2012–2013 гг., несмотря на существенные различия в их интенсивности, было зарегистрировано практически в одно и то же время, на 44–45 неделе (конец октября — начало ноября) соответствующего года, продолжительность этих подъемов также практически была одинаковой.

В процессе научно-исследовательских работ по совершенствованию системы эпидемиологического надзора за РВИ и ее внедрения в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии осуществлялся молекулярно-эпидемиологический мониторинг за циркулирующей популяцией возбудителя. Типирование штаммов ротавирусов группы А проводилось с помощью мультиплексной ПЦР по генам, кодирующим структурные белки вириона VP4 и VP7. VP7 является главным гликопротеиновым антигеном внешней оболочки и определяемый им серотип обозначается как G-тип. VP4 обозначается как P-тип. Блокирование этих антигенов специфическими антителами приводит к нейтрализации вируса и утрате им инфекционных свойств, как это происходит у лиц, имеющих иммунитет к возбудителю. В результате молекулярно-эпидемиологического мониторинга собирается информация о типовой структуре популяции возбудителя, циркулирующей на определенной территории, изменении этой структуры, в т. ч. появлении новых штаммов вируса для прогнозирования эпидемиологической ситуации и оценки ожидаемой эффективности противоротавирусных вакцинных и лактоиммуноглобулиновых препаратов.

Результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга за популяцией ротавирусов представлены в таблице, из них следует, что в г. Минске выявляются ротавирусы с наиболее распространенной во всем мире типовой биноминальной формулой. Имеющиеся в мире и зарегистрированные в Республике Беларусь вакцинные препараты, а также разработанное в РНПЦ эпидемиологии и ми-

кробиологии и находящееся на стадии освоения промышленного производства в СП «Фармлэнд» лекарственное средство «Лактоиммуноглобулин противоротавирусный» окажутся эффективными в отношении циркулирующей популяции ротавирусов.

Таблица — Типовая G-P-структура изолятов ротавирусов в г. Минске в 2008–2012 гг.

| Генотипы | Год | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2008 | | 2009 | | 2010 | | 2011 | | 2012 | |
| | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | % |
| G1P[8] | 15 | 12,2 | 10 | 7,4 | 10 | 8.9 | 5 | 4,0 | 4 | 3,8 |
| G2P[4] | 23 | 18,7 | 37 | 27,4 | 18 | 16,1 | 10 | 8,0 | 3 | 2,8 |
| G3P[6] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1,0 |
| G3P[8] | 10 | 8,1 | 13 | 9,6 | 31 | 27,7 | 67 | 53,6 | 29 | 27,6 |
| G3P[9] | 0 | 0 | 2 | 1,5 | 1 | 0,9 | 2 | 1,6 | 0 | 0 |
| G4P[8] | 58 | 47,2 | 41 | 30,4 | 52 | 46,4 | 31 | 24,8 | 48 | 45,7 |
| G4P[4] | 0 | 0 | 4 | 2,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1,0 |
| G9P[8] | 0 | 0 | 1 | 0,8 | 0 | 0 | 3 | 2,4 | 15 | 14,2 |
| G3+G4P[8] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2,4 | 1 | 1,0 |
| G9+G4P[8] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1,0 |
| G1P[x] | 2 | 1,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G2P[x] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0,8 | 0 | 0 |
| G3P[x] | 0 | 0 | 12 | 8,9 | 0 | 0 | 1 | 0,8 | 0 | 0 |
| GxP[4] | 13 | 10,6 | 15 | 11,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GxP[8] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1,6 | 2 | 1,9 |
| GxP[4]+P[6] | 2 | 1,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Всего исследовано | 123 | 100 | 135 | 100 | 112 | 100 | 125 | 100 | 105 | 100 |

Примечание. x — тип не установлен.

Из таблицы видно также, что типовая структура популяции ротавирусов периодически изменяется. Это проявляется в смене доминирующих типов возбудителя и увеличении доли возбудителей с другой биноминальной формулой. Считается, что такие изменения типовой структуры популяции ротавирусов являются причиной осложнений эпидемиологической ситуации. Наиболее заметные изменения такого плана происходят в течение 1–2 лет, что совпадает с цикличностью эпидемического процесса РВИ.

Оценивая полученные результаты можно отметить, что эпидемиологическая ситуация в отношении РВИ в г. Минске в целом характеризуется стабильностью, при этом отмечаются циклические (сезонные и годовые) колебания уровня заболеваемости преимущественно детского, главным образом в возрасте до двух лет, населения. Отмечаемый по данным официальной медицинской статистики более высокий по сравнению с среднереспубликанским показатель заболеваемости РВИ в г. Минске обусловлен, в основном, более высоким уровнем организации диагностики и выявляемости этой инфекции в столице республики. Эпидемиологический надзор за РВИ в г. Минске осуществляется с использованием усовершенствованной в последние годы системы эпидемиологического надзора, включающей подсистемы популяционного и дозорного надзора. Результаты проведения дозорного эпидемиологического надзора на базе УЗ «Детская инфекционная клиническая больница» г. Минска были представлены ранее [5]. Внедрение усовершенствованной системы эпидемиологического надзора за РВИ в г. Минске происходит поэтапно. К настоящему времени помимо дозорного надзора в городе осуществляется молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркулирующей популяции ротавирусов, что позволило установить целесообразность вакцинопрофилактики этой инфекции. Проведение серологического мониторинга в дальнейшем позволит оценить состояние популяционного иммунитета к ротавирусам в разрезе различных контингентов населения, контролировать на-

пряженность поствакцинального иммунитета и эффективность вакцинации в отношении отдельных типов возбудителя. В стадии освоения находятся и автоматизированные информационные технологии, использование которых предусматривается в системе эпидемиологического надзора за РВИ.

**Выводы.** РВИ является значимой социально-экономической и медицинской проблемой в г. Минске, актуальной также для всего мира. Важнейшим механизмом изучения эпидемиологических особенностей этой инфекции и борьбы с ее неконтролируемым эпидемическим распространением является эпидемиологический надзор. В последнее время с этой целью используется современная система эпидемиологического надзора за РВИ, обеспечивающая сочетанное осуществление популяционного и дозорного эпидемиологического надзора, проведение молекулярно-эпидемиологического мониторинга вирусной популяции и серологического мониторинга популяционного иммунитета — в человеческой. С помощью эпидемиологического надзора оценивается эпидемиологическая ситуация, разрабатываются научно обоснованные противоэпидемические и профилактические мероприятия. Так, в частности установлена ожидаемая эффективность противоротавирусных вакцинных и иммуноглобулиновых препаратов в отношении циркулирующих здесь типов возбудителя, а также целесообразность вакцинопрофилактики РВИ в г. Минске, разработаны методы и средства контроля ее эффективности. Реализация этих мер, несомненно, приведет к снижению заболеваемости РВИ.

**Литература**

1. Этиологическая структура острых инфекционных диарей у детей и взрослых / С.В. Халиулина [и др.] // Практ. медицина. — 2012. — №:1(56). – С.13-15

2. Вирусные острые кишечные инфекции: метод. рекомендации / Д.В. Малявко, С.Е. Украинцев. — Минск: М-во здравоохр. Респ. Беларусь, 2005. — 59 с.

3. Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией: инстр., утв. МЗ РБ № 020-1211 от 15.12.2011 / В.Г. Гудков [и др.] // Совр. методы диагностики, лечения и профилактики: сб. инстр. — Минск: ГУ РНМБ, 2012.

4. Санитарные нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения острых кишечных инфекций»: Пост. М-ва здравоохр. Респ. Беларусь № 31 от 29 марта 2012 г.

5. Эпидемиологический надзор за ротавирусной инфекцией в Республике Беларусь // В.Г. Гудков [и др.] // Здравоохранение. — 2011. — № 12. — С. 20–27.

## ROTAVIRUS INFECTION: EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND THE SURVEILLANCE SYSTEM IN MINSK

**Glinskaya I.N.[1], Virinskaya A.S.[2], Dashkevich A.M.[2], Novatskaya Yu.V.[2], Svetogor T.N.[2], Gudkov V.G.[2]**

*[1]Minsk Municipal Center for Hygiene and Epidemiology;*

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

The paper presents the analysis of epidemiological data on rotavirus infection (RVI) in Minsk for the period for 2001–2012. In general, the epidemiological situation is stable, marked cyclical fluctuations (seasonal and annual) in the morbidity of mainly among children under the age of 2 years. Enhanced surveillance system includes the implementation of population-based and sentinel surveillance, RVI laboratory diagnosis, conducting of molecular epidemiological and serological monitoring, use of information technologies, the development of anti-epidemic measures and evaluate its effectiveness.

**Keywords:** rotavirus infection, surveillance, Minsk city.

Поступила 06.09.2013

# ТЯЖЕЛЫЕ ОСТРЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ ПО ГРИППУ 2010–2013 ГГ. В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Грибкова Н.В., Лапо Т.П., Чешенок Е.В., Сивец Н.В.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Представлены результаты вирусологического мониторинга случаев ТОРИ на протяжении эпидемических сезонов по гриппу 2010–2013 гг. Определены факторы риска развития ТОРИ.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, ТОРИ, факторы риска, респираторные вирусы.

**Введение.** Грипп является одной из важнейших соцально-экономических проблем. В целях предотвращения ущерба от гриппа во время ежегодных эпидемий и, особенно, от пандемий, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), начиная с 1945 г., уделяет большое внимание эпидемиологическому надзору за гриппом. За этот длительный период формы надзора совершенствовались, и требованием сегодняшнего дня помимо использования стандартных методов лабораторной диагностики гриппа и эпидемиологических показателей, является также осуществление мониторинга за тяжелыми острыми респираторными инфекциями (ТОРИ). Действующие в нашей стране нормативные документы, регламентирующие эпидемиологический надзор за гриппом, учитывают требования ВОЗ и предусматривают подразделение респираторных инфекций на острые респираторные инфекции (ОРИ), гриппоподобные заболевания (ГПЗ) и ТОРИ [1]. К категории ТОРИ отнесены «заболевания, характеризующиеся сочетанием трех симптомов (температура тела более 38°С; кашель или боль в горле; одышка или затрудненное дыхание), начавшиеся и протекающие в течение предыдущих 7 дней, приводящие к госпитализации» [1]. В эпидемический сезон по гриппу, как правило, возрастает количество госпитализированных пациентов, относящихся к категории ТОРИ. Последняя пандемия гриппа, обусловленная распространением вируса гриппа A(H1N1)pdm09, подчеркнула необходимость установления этиологии тяжелых пневмоний и определения групп риска развития ТОРИ [2]. Возросшее внимание к данной категории респираторных инфекций объясняется причиняемой ими значительной нагрузкой на службу здравоохранения, вплоть до госпитализации пациентов в отделения интенсивной терапии, увеличением расходов на лечение и вероятностью роста инвалидизации. В нашей стране вирусологический мониторинг ТОРИ ранее не проводился и начал внедряться с 2010 г.

**Целью** данного сообщения является анализ случаев ТОРИ во время эпидемических сезонов по гриппу 2010/11, 2011/12 и 2012/13 гг.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили назофарингеальные мазки, полученные в рамках дозорного эпидемиологического надзора за гриппом и ОРВИ в сезоны 2010/11 2011/12 и 2012/13 гг. от пациентов, госпитализированных в течение семи дней от начала заболевания тяжелой острой респираторной инфекцией.

Выявление генетического материала вируса гриппа в исследуемых образцах осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени. В работе использовали диагностические наборы «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» и «Орви-скрин-FL»(ФБУ НЦНИИ эпидемиологии, Роспотребнадзор, Москва, РФ). Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с применением набора «Рибо-сорб», реакцию обратной транскрипции — с набором реагентов «Реверта-L» (производство ФБУ НЦНИИ эпидемиологии, Роспотребнадзор, Москва, РФ). Постановку ПЦР проводили на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett research, Австралия) в соответствии с рекомендациями производителя наборов.

**Результаты и их обсуждение.** На группу ТОРИ в среднем за три эпидемических сезона приходилось до 37% исследуемых образцов. В большинстве случаев в направлении на исследование был выставлен клинический диагноз «пневмония». Как показали лабораторные исследования, количество случаев ТОРИ, ассоциированных с гриппом, в анализируемые сезоны, зависело от интенсивности эпидемического процесса. Из данных, представленных в таблице, видно, что количество случаев ТОРИ, где была выявлена РНК вируса гриппа, определялось особенностями наблюдаемого сезона (таблица).

Таблица — Характеристика случаев ТОРИ в эпидемические сезоны по гриппу в период 2010/13 гг.

| Эпидемический сезон | Исследовано образцов | Случаи ТОРИ, % | ТОРИ, ассоциированных с гриппом, % | Доминирующий вирус гриппа | Возрастные группы с ТОРИ | ТОРИ+др. респ. агенты |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2010/11 гг. | 1440 | 26 | 9,2 | A(H1N1) pdm09 | 18–64 | ВПГ3, ВПГ2, РСВ, микоплазмы, хламидии |
| 2011/12 гг. | 1750 | 38 | 2,4 | A(H3N2) | 0–4 | РСВ, МПВ, РВ |
| 2012/13 гг. | 1821 | 47 | 11,0 | A(H1N1) pdm09, A(H3N2), B | 0–17; 18–64 | АДВ, РВ, РСВ,РВ+БВ, микоплазмы |

Так, первая эпидемия гриппа после пандемии 2009 г. развилась в характерные для страны сроки и была средней интенсивности [3]. Доминирующим вирусом в данном сезоне был вирус гриппа, аналогичный пандемическому вирусу A(H1N1)pdm09. В сезон 2011/12 гг. респираторная заболеваемость так и не превысила эпидемический уровень на протяжении всего эпидемического сезона, и лишь на 16 календарной неделе незначительно возросла частота выявления вирусов гриппа A(H3N2). Эпидемический подъем заболеваемости в сезон 2012/13 гг. отличался необычной длительностью: на протяжении 12-ти недель сменяя друг друга циркулировали вирусы гриппа А, подобные пандемическому A(H1N1)pdm09, A(H3N2), и вирусы гриппа В двух эволюционных линий. В редких случаях помимо вирусов гриппа при лабораторном исследовании образцов, полученных от пациентов группы ТОРИ, были также выявлены вирусы парагриппа 3 и 2 типов (ВПГ3, ВПГ2), респираторно-синцитиальный виру (РСВ), аденовирусы (АДВ), бокавирус (БВ) и риновирус (РВ), а также микоплазмы и хламидии.

На протяжении наблюдаемых трех эпидемических сезонов наиболее высокая респираторная заболеваемость зарегистрирована среди детей в возрасте от 0 до 17 лет. Однако возраст пациентов, нуждавшихся в госпитализации по поводу ТОРИ, в анализируемые сезоны варьировал (таблица). Так, в первый постпандемический год (сезон 2010/11), характеризовавшийся преобладанием пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, 60% случаев ТОРИ, ассоциированных с вирусами гриппа, наблюдали среди пациентов в возрасте от 18 до 64 лет. В сезон 2011/12 гг. в конце эпидемического сезона возросла активность дрейфового варианта вируса гриппа A(H3N2), и наиболее уязвимой группой были дети от 0 до 4 лет (50%). В сезон 2012/13 гг., когда последовательно циркулировали вирусы гриппа А и В, примерно с одинаковой частотой госпитализировали пациентов группы ТОРИ с лабораторно подтвержденным диагнозом «грипп» в возрастных категориях от 0 до 17 и 18–64 лет (42 и 46% соответственно). Вместе с тем отличительной особенностью эпидемического сезона 2012/13 гг. по сравнению с предыдущими сезонами был рост случаев ТОРИ, ассоциированных с гриппом, среди лиц старше 65 лет.

Следует отметить, что на протяжении трех анализируемых сезонов по гриппу в категорию ТОРИ попадали пациенты, имевшие в анамнезе такие факторы риска развития постгриппозных осложнений, как ожирение, хронические заболевания сердечно-сосудистой системы и органов дыхания, иммунодефицитные состояния и беременность. Приведенная в настоящем сообщении информация отражает начальные этапы осуществления мониторинга ТОРИ в нашей стране и не может представить полную характеристику этиологических агентов, послуживших причиной развития тяжелого острого респираторного заболевания, сопровождающегося госпитализацией пациента. Дальнейшего уточнения требуют также и факторы риска развития ТОРИ.

**Выводы.** Представленные результаты свидетельствуют об актуальности проводимого вирусологического мониторинга случаев ТОРИ, что будет способствовать прогнозированию нагрузки на ОИТ и улучшению качества медицинской помощи госпитализированным пациентам в период эпидемий гриппа. Вирусологический мониторинг случаев ТОРИ позволит определить спектр респираторных вирусов, способствующих развитию ТОРИ и определить связь между факторами риска и тяжестью исходов ТОРИ. В целях обеспечения объективной оценки случаев ТОРИ необходи-

мо исследовать клинические образцы не только от пациентов с пневмонией. Предполагается, что требующие госпитализации многие тяжелые острые респираторные инфекции, связанные с гриппом, обусловлены обострением других хронических заболеваний или физиологических состояний, таких, как например, хронические болезни легких или сердца, беременность, иммунодефицитные состояния.

**Литература**

1. Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы «Требования к проведению эпидемического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь» от 12 октября 2010г № 132.
2. Этиология летальных пневмоний в период развития пандемии, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm2009 в России / В.В. Лаврищева [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2013. — № 3. — С. 17–21.
3. Шмелева, Н.П. Эпидемия гриппа в Республике Беларусь в первый постпандемический сезон 2010–2011 гг. / Н.П. Шмелева, Н.В. Грибкова, Н.В. Сивец // Здравоохранение. — 2011. — № 10. — С. 31–36.

## SEVERE ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS IN BELARUS DURING INFLUENZA SEASONS OF 2010–2013

**Gribkova N.V., Lapo T.P., Chashanok E.V., Sivets N.V.**

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

The results of virological monitoring of SARI cases during three influenza seasons are presented. The risk factors of SARI evolution are detected.

**Keywords:** influenza, SARI, risk factors, respiratory viruses.

Поступила 02.09.2013

## ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ А В Г. МИНСКЕ: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

**Гудков В.Г.[1], Глинская И.Н.[2], Дашкевич А.М.[1], Виринская А.С.[1], Кучко Е.В.[2], Плотникова К.Ю.**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Эпидемический процесс вирусного гепатита А (ГА) в г. Минске в последние 10 лет характеризуется низкой интенсивностью, выраженной тенденцией заболеваемости к снижению, сезонностью. В возрастной структуре заболевших преобладает взрослое население. Вакцинация оказывает благоприятное влияние на эпидемиологическую ситуацию.

Система эпидемиологического надзора за ГА в г. Минске в целом эффективна, однако может быть усовершенствована путем использований новых отечественных научных разработок.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит А, вирус гепатита А, эпидемический процесс, эпидемиологический надзор, научные разработки.

**Введение.** Вирусный гепатит А (ГА) наносит обществу существенный экономический ущерб. По данным Роспотребнадзора экономические потери от одного случая ГА в России составляет более 1,5 тыс. долларов США, а в других экономически развитых странах — 3824 и более долларов США.

Повышение уровня благосостояния и санитарно-гигиенической культуры населения, санитарно-гигиенических стандартов в обществе, вакцинация детей против ГА, а также совершенствование эпидемиологического надзора за инфекцией в последние 20–25 лет привели к существенному снижению заболеваемости этой инфекцией в ряде стран, включая Республику Беларусь. Однако, несмотря на многолетнее снижение заболеваемости и относительное эпидемиологическое благополучие проблема ГА во всем мире остается актуальной. Это подтверждают недавние крупные вспышки и эпидемические подъемы заболеваемости ГА в России (2005–2007; 2010), Латвии (2008), Болгарии (2011) и некоторых других странах, происшедшие также на фоне многолетнего спада за-

болеваемости. Так, в Латвии по данным ВОЗ в 2005–2007 гг. показатели заболеваемости ГА последовательно снижались с 6,16 до 0,66 случаев на 100 тыс. населения, а в 2008 г. на этом фоне полного благополучия в стране произошел эпидемический подъем ГА, охвативший около 3000 человек (124,3 случаев на 100 тыс. населения). Двукратный рост заболеваемости (1,78 на 100 тыс. населения) в 2010 г. в нашей стране также свидетельствует, что ГА, по-прежнему, требует эффективного контроля.

Периодические подъемы и вспышки заболеваемости в соседних странах, а также интенсивная миграционная (трудовая, туристическая) активность населения создают потенциальную возможность обострения эпидемиологической ситуации в отношении ГА в нашей стране. Это обусловливает необходимость постоянного осуществления и совершенствования на основе достижений науки и накопленного опыта эпидемиологического надзора за ГА.

**Целью работы** являлось изучение эпидемиологической ситуации в отношении ГА в г. Минске и определение путей совершенствования эпидемиологического надзора за этой инфекцией.

**Материалы и методы.** Использовались общепринятые методы эпидемиологического анализа и стандартные методы статистической обработки данных. Использовались также данные статистических отчетов об отдельных инфекционных, паразитарных заболеваниях и их носителях по ф.6.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты эпидемиологического анализа заболеваемости ГА показали, что удельный вес ГА в этиологической структуре острых вирусных гепатитов (ОВГ) на протяжении последних 10 лет неуклонно снижается. Так, если в 2003 г. его доля в структуре ОВГ составила 47%, то в 2012 г. — всего 18%.

Интенсивность эпидемического процесса ГА в указанный период также снижалась: показатель заболеваемости населения снизился с 11,06 случаев на 100 тыс. населения в 2003 г. до 0,94 случая на 100 тыс. населения в январе–июле 2013 г. При этом в 2012 г. в г.Минске отмечался минимальный уровень заболеваемости ВГА за последние 10 лет.

На рисунке 1 представлены графики заболеваемости и тенденции заболеваемости ГА населения г. Минска за 2003–2012 гг.

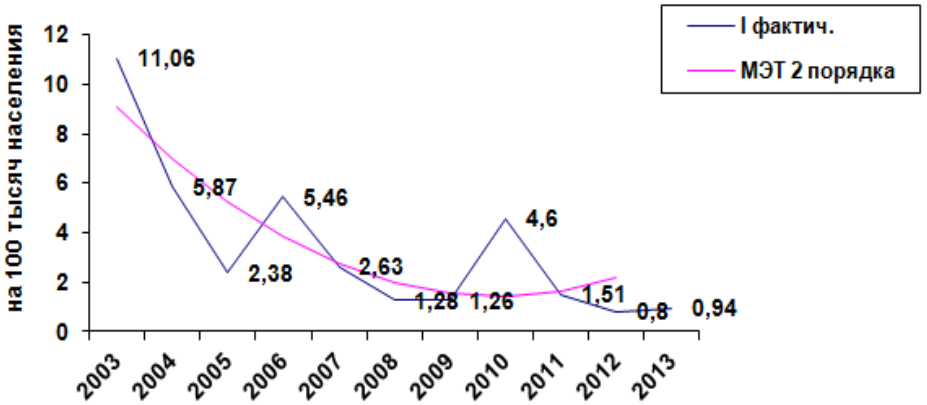



Рисунок 1 — Многолетняя динамика и тенденция заболеваемости ГА населения г. Минска за 2003 — 7 мес. 2013 гг.

Как видно из представленных данных интенсивность эпидемического процесса ГА в г. Минске в последние 10 лет имеет выраженную тенденцию к снижению, средний темп этого снижения составляет 16,2%. Следует, однако, обратить внимание, что эпидемический процесс ГА в 2003–2012 гг. характеризовался периодическими подъемами и спадами заболеваемости. Признаком наступления очередного циклического подъема заболеваемости является существенный (в 1,8 раза) рост заболеваемости за 8 мес. текущего года по сравнению с аналогичным периодом 2012 г. Это может свидетельствовать о недостаточной управляемости эпидемического процесса средствами вакцинопрофилактики и наличии у него в этой ситуации определенного потенциала роста.

В клинической картине заболевания у пациентов с ГА в последние годы доминируют среднетяжелые формы болезни, которые легче поддаются выявлению и учету. Следует, однако, учитывать, что хотя легкие клинические формы этого заболевания регистрируются в единичных случаях, это

может не отражать их истинного места в эпидемическом процессе ГА, так как такие случаи нередко остаются нераспознанными. Это вполне согласуется с многочисленными данными о том, что реальная заболеваемость ГА значительно выше регистрируемой, поскольку на 1 случай, имеющий клинические проявления приходится 5–7 и более бессимптомных (безжелтушных) форм, которые, как правило, не регистрируются.

Эпидемиологической особенностью ГА в настоящее время является тенденция смещения уровня заболеваемости от детского населения в более старшие возрастные группы. Так, в 2003 г. удельный вес заболевших ГА лиц в возрасте старше 18 лет составлял 70,53%, а в 2013 г. (за 7 мес.) этот показатель был существенно выше — 94,4%. Возрастная структура заболеваемости ГА в текущем году приведена на рисунке 2.

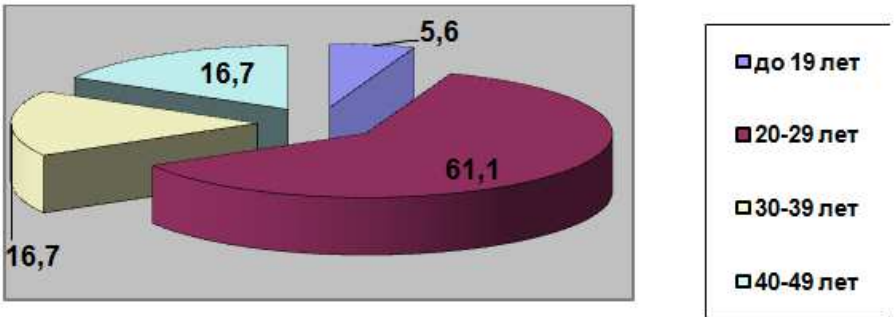



Рисунок 2 — Возрастная структура заболеваемости ВГА в г. Минске за 7 мес. 2013 г., %

Как видно из представленных на рисунке 2 данных в возрастной структуре пациентов с ГА отмечается существенное преобладание взрослого населения. Причем наиболее интенсивно в эпидемический процесс вовлекается молодое трудоспособное население — среди заболевших доминируют лица 20–29 лет (61% случаев заболевания). Это, вероятно, может быть обусловлено отсутствием у них естественного иммунитета к возбудителю заболевания из-за снижения интенсивности циркуляции вируса на протяжении последние более чем 20 лет. Объективное представление о состоянии и динамике популяционного иммунитета различных возрастных групп населения к вирусу может быть получено при систематическом проведении серологического мониторинга.

Значительную роль в управляемом снижении интенсивности эпидемического процесса ГА в Минске оказала реализуемая здесь стратегия вакцинопрофилактики этой инфекции. Она состоит из 4 последовательных направлений и заключается в сплошной вакцинации детей в возрасте 6 лет, поступающих в начальную школу (с 2003 г.), постэкспозиционной вакцинации в очагах ГА (с 2004 г.), вакцинации групп риска. К последней категории отнесены дети в возрасте 6–13 лет, проживающие в общежитиях, и взрослые лица, работающие на эпидемиологически значимых объектах (с 2005 г.). С 2008 г. осуществляется плановая вакцинация детей в возрасте 18 мес.

На рисунке 3 представлена динамика заболеваемости населения г. Минска в возрастном разрезе за 2001–2013 (7 мес.) гг. с учетом проводимых кампаний вакцинации.

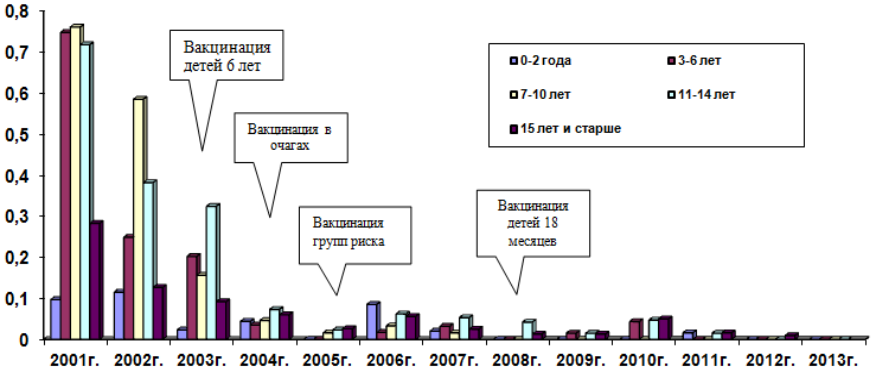



Рисунок 3 — Многолетняя динамика заболеваемости вирусным гепатит А населения г. Минска по возрастным группам за 2001 г. — 7 мес. 2013 г. (показатель на 1000 контингента)

Приведенные данные свидетельствуют, что результаты реализации стратегии вакцинопрофилактики ГА в г. Минске отчетливо проявляются при эпидемиологическом анализе заболеваемости. Так, если в довакцинальный период в возрастной структуре заболевших лидировали дети в возрастной группе 7–10 лет, то к 2007 г. показатель заболеваемости в этой возрастной группе снизился в 9,75 раза, а начиная с 2008 г. случаев заболевания ГА у детей этого возраста вообще не выявлялось.

Эффективность осуществляемой в г. Минске вакцинопрофилактики ГА подтверждается структурой заболевших — более 80% случаев заболевания зарегистрировано у непривитых лиц. Вместе с тем, требуют изучения причины заболевания ГА у привитых лиц. Это может быть сделано путем оценки их иммунного статуса, а также оценки эффективности вакцинации путем определения титра антител в сыворотке крови привитых в динамике.

На рисунке 4 представлена заболеваемость ГА за 2012–2013 гг. в годовой динамике.

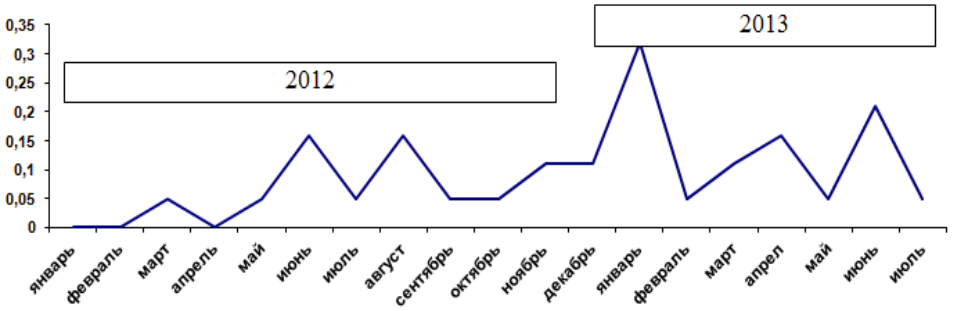



Рисунок 4 — Годовая динамика заболеваемости вирусным гепатитом А в г. Минске в 2012–2013 гг. (7 мес.) на 100 тыс. населения

Как видно из данных рисунка 4 для эпидемического процесса характерна осенне-зимняя сезонность с переходом на первые весенние месяцы. В январе-июле 2013 г. заболеваемость распределялась неравномерно. Максимальный уровень заболеваемости наблюдался в январе (0,32 случая на 100 тыс. населения). Таким образом, наряду с периодичностью в многолетней динамике, эпидемический процесс ГА в г. Минске сохраняет сезонность в годовой динамике.

Вероятность трансграничного заноса инфекции в г. Минске представляет реальную эпидемиологическую опасность. Так, по данным эпидемиологических расследований удельный вес таких случаев ГА за 2003–2013 гг. (7 мес.) составил 8,9% (в расчетные сроки заражения заболевшие находились в Египте, Туркменистане, Узбекистане, Индии). В части случаев эпидемиологическое расследование опиралось на данные молекулярно-биологического типирования генома ВГА, изолированного от пациента, проведенного в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Удельный вес случаев заноса инфекции в 2013 г. составил 38,9% из Египта, Туркменистана, Узбекистана, Индии.

Оценивая в общем систему контроля ГА в г. Минске, можно отметить ее эффективность, неоспоримым свидетельством которой является достигнутое эпидемиологическое благополучие в отношении этой инфекции. Вместе с тем представляется достаточно очевидным, что дальнейшее совершенствование системы эпидемиологического надзора на основе использования целевых отечественных научных разработок последних лет позволит повысить ее эффективность. К таким разработкам относятся методы исследований, предназначенные для использования в интересах санитарно-эпидемиологической службы и профильных учреждений здравоохранения республики, изложенные в инструкциях по применению: «Метод генотипирования вируса гепатита А», «Мониторинг популяционного иммунитета к вирусу гепатита А», «Метод определения вирулицидной активности дезинфектантов в отношении вируса гепатита А с помощью антигенсвязывающей полимеразной цепной реакции», а также новое отечественное изделие медицинского назначения — «Тест-система для количественного определения иммуноглобулинов G к вирусу гепатита А методом иммуноферментного анализа».

Метод генотипирования ВГА [1] позволяет осуществлять генотипирование выделенных изолятов возбудителя или его РНК, определять страну его происхождения, поскольку в разных географических регионах циркулируют различные генотипы вируса. Генетическая характеристика возбудителя, обнаруженного в биопробах от пациентов или из объектов внешней среды путем анализа

нуклеотидной последовательности вирусного генома, способствует установлению связи между случаями заболевания, выявлению источников и путей распространения инфекции, эффективному предотвращению ее распространения.

Систематический молекулярно-эпидемиологический мониторинг ВГА позволит определять спектр циркулирующих штаммов, их доминирующие субгенотипы, своевременно отслеживать их смену, осуществлять прогнозирование эпидситуации. Кроме того, молекулярно-эпидемиологическое типирование ВГА является важным инструментом при расшифровке вспышек инфекции и изучении путей миграции возбудителя в региональном и глобальном масштабе и др. Этот метод успешно апробировался в г. Минске [2], целесообразность его дальнейшего применения не вызывает сомнений.

Инструкция по применению (проект) «Мониторинг популяционного иммунитета к вирусу гепатита А» содержит описание условий и метода проведения лабораторных исследований по оценке специфического иммунитета к ВГА. В соответствии с этой разработкой осуществляется определение уровня популяционного иммунитета к вирусу гепатита А в эпидемиологических целях (характеристика иммунной прослойки, определение контингентов населения, не имеющих протективного иммунитета к возбудителю, оценка эффективности вакцинации и используемых вакцин). Предусматривается также определение специфического иммунного статуса у лиц, контактировавших с источником инфекции, при оценке необходимости вакцинации и ревакцинации.

Средством проведения таких исследований может служить разработанная для этих целей указанная выше тест-система. Обе разработки представлены для регистрации в установленном порядке.

Наконец, использование метода определения вирулицидной активности дезинфектантов в отношении ВГА с помощью антигенсвязывающей полимеразной цепной реакции, запатентованного в республике [3], позволяет контролировать эффективность дезинфектантов и дезинфекции в отношении циркулирующих штаммов вируса, существенно различающихся по своей резистентности как между собой, так и по сравнению с прототипными штаммами возбудителя.

**Выводы.** Эпидемический процесс ГА в г. Минске в последние 10 лет характеризуется относительно низкой интенсивностью, выраженной тенденцией заболеваемости к снижению со средним темпом 16,2%, сезонностью. В возрастной структуре заболевших отмечается абсолютное преобладание взрослого населения, более 80% из них не были вакцинированы.

Осуществляемая в городе вакцинация населения против ГА оказывает существенное благоприятное влияние на эпидемиологическую ситуацию, однако, среди заболевших имеется часть вакцинированных лиц.

Система эпидемиологического надзора за ГА в г. Минске, в целом, эффективна, однако может быть усовершенствована путем использований новых отечественных научных разработок, обеспечивающих возможность осуществления молекулярно-эпидемиологического мониторинга циркулирующей популяции возбудителя, динамическую оценку популяционного иммунитета и эффективности вакцинации, применение эффективных в отношении такого высоко резистентного возбудителя, как ВГА, дезинфицирующих средств.

**Литература**

1. Метод генотипирования вируса гепатита А / К.Ю. Плотникова [и др.]: инстр. по применению, утв. МЗ РБ 18.07.2012; рег. № 026 12 11.

2. Молекулярно-биологическое типирование возбудителя в системе эпидемиологического надзора за вирусным гепатитом А / К.Ю. Плотникова [и др.] // Мед. новости. — 2012. — № 12. — С. 65–67.

3. Пат. 12311 Респ. Беларусь, МПК7 А 61L 2/16 «Способ определения вирулицидного действия дезинфектантов»; авт. В.Г. Гудков [и др.].

## VIRAL HEPATITIS A IN MINSK: THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND THE WAYS OF IMPROVEMENT OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE

**Gudkov V.G.[1], Glinskaya I.N.[2], Dashkevich A.M.[1], Virinskaya A.S.[1], Kuchko E.V.[2], Plotnikova K.Yu.**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Minsk City Center for hygiene and epidemiology, Minsk, Belarus*

Epidemic process of viral hepatitis a (HA) in Minsk is characterized by low intensity expressed by declining incidence trend in the last 10 years. In the age structure the adult population is more often infected. Vaccination has the beneficial effect on the epidemiological situation. The epidemiological surveillance system for HA in Minsk is effective in general, but could be improved through the use of new domestic scientific research.

**Keywords:** viral hepatitis A, epidemic process, scientific development.

Поступила 04.09.2013

## ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ПАРВОВИРУСА В19 НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ В ПЕРИОД 2005–2012 ГГ.

**Ермолович М.А.[1], Семейко Г.В.[1], Самойлович Е.О.[1], Бабенко А.С.[2], Черновецкий М.А.[2]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Филогенетический анализ 139 образцов парвовируса В19, циркулировавших на территории Беларуси в период 2005–2012 гг., выявил, что 138 из них принадлежат к генотипу 1 и один — к генотипу 3. Штаммы генотипа 1 формируют два кластера (1 и 2), и ежегодно в стране выявляются парвовирусы В19, принадлежащие к каждому из них. До 2010 г. преимущественное распространение имели вирусы кластера 1, а вирусы кластера 2 выявлялись в основном в Могилевской области. В последние годы произошла смена доминирующего варианта парвовируса В19 и кластер 2 получил широкое распространение во всех регионах страны. Единственный парвовирус В19, относившийся к генотипу 3, имел завозное происхождение и был выявлен в 2006 г. у прибывшего из Казахстана пациента с апластическим кризом.

**Ключевые слова:** парвовирус В19, генотип, генетический вариант.

**Введение.** Парвовирусная инфекция человека широко распространена практически по всему земному шару и имеет широкий спектр клинических проявлений. Возбудитель, парвовирус В19, принадлежит к роду *Erythrovirus* подсемейства *Parvovirinae* семейства *Parvoviridae* и представляет собой ДНК-содержащий безоболочечный вирус размером 22–24 нм. Геном парвовируса представлен линейной одноцепочечной инфекционной ДНК длиной 5596 н.о. [1].

На основании филогенетического анализа фрагмента генома длиной 994 нуклеотида выделяют три генотипа парвовируса В19 [2]. Наиболее широко распространены в мире вирусы генотипа 1, вирусы генотипов 2 были ранее выявлены во Франции, Финляндии, Германии, Великобритании, Бразилии, США и Вьетнаме, однако в настоящее время они практически не выявляются. Генотип 3 имеет наибольшее распространение в странах Африканского континента, но в последние время он также был обнаружен во Франции, Великобритании, Бразилии, Болгарии и Греции, а также в Германии у прибывших из Северной Африки и Турции лиц [3].

В Беларуси с 2005 г. диагностика парвовирусной инфекции и филогенетический анализ возбудителя проводится в республиканской референс-лаборатории по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии), куда направляются образцы крови от пациентов из всех регионов страны. Настоящее исследование посвящено анализу генетической вариабельности парвовирусов В19, циркулировавших в разных регионах Беларуси в период 2005–2012 гг.

**Материалы и методы.** Генотипирование и последующий филогенетический анализ проведен для 139 образцов парвовируса В19, полученных в 2005–2012 гг. от лиц с парвовирусной инфекцией из всех регионов Беларуси, в том числе от 136 пациентов с экзантемной формой парвовирусной инфекции (инфекционной эритемой) и 3 пациентов с гемолитической анемией.

Для всех образцов был амплифицирован NS1/VP1u фрагмент генома длиной 994 н.о., рекомендованный для генотипирования парвовируса В19. Вирусную ДНК выделяли из 200 мкл сыворотки крови с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Нидерланды) согласно инструкции производителя. Искомый фрагмент генома получали методом гнездовой ПЦР, используя описанные в литературе праймеры e1855f, e1863f, B19-R1 and B19-R2 [2, 3]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с окраской бромидом этидия.

Секвенирование проводили с использованием коммерческого набора Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Нидерланды) на капиллярном секвенаторе Avant 3100 (Applied Biosystems, Нидерланды). Для сиквенсной реакции использовали праймеры второго («гнездового») раунда ПЦР. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA версии 5 [4] на основе метода Neighbor Joining и двухпараметрической модели Kimura.

**Результаты и их обсуждение.** Из 139 штаммов парвовируса B19, использованных для филогенетического анализа, 4 было получено в 2005 г., 85 — в 2006 г., 7 — в 2007 г., 7 — в 2008 г., 5 — в 2010 г., 13 — в 2011 г., 18 — в 2012 г. Наибольшее число парвовирусов, полученных в 2006 г., обусловлено вспышкой парвовирусной инфекции, которая регистрировалась в г. Минске [5]. Для построения филогенетического древа из 85 штаммов, относящихся к 2006 г., были использованы 38, отличавшихся друг от друга на одно или более нуклеотидных оснований. В 2009 г. в стране отмечался наиболее низкий уровень заболеваемости парвовирусной инфекцией и в связи с неадекватным забором образцов ни в одном случае генотипировать возбудитель не удалось.

Сравнительный анализ парвовирусов B19, выявленных в Беларуси в 2005–2012 гг., и референс-штаммов 1, 2 и 3 генотипов показал, что все исследованные вирусы, за исключением одного, принадлежали к генотипу 1 (рисунок). Один парвовирус B19, полученный в 2006 г. от пациента детского онкогематологического стационара, прибывшего на лечение из Казахстана с диагнозом «хроническая гемолитическая анемия, апластический криз», принадлежал к генотипу 3.

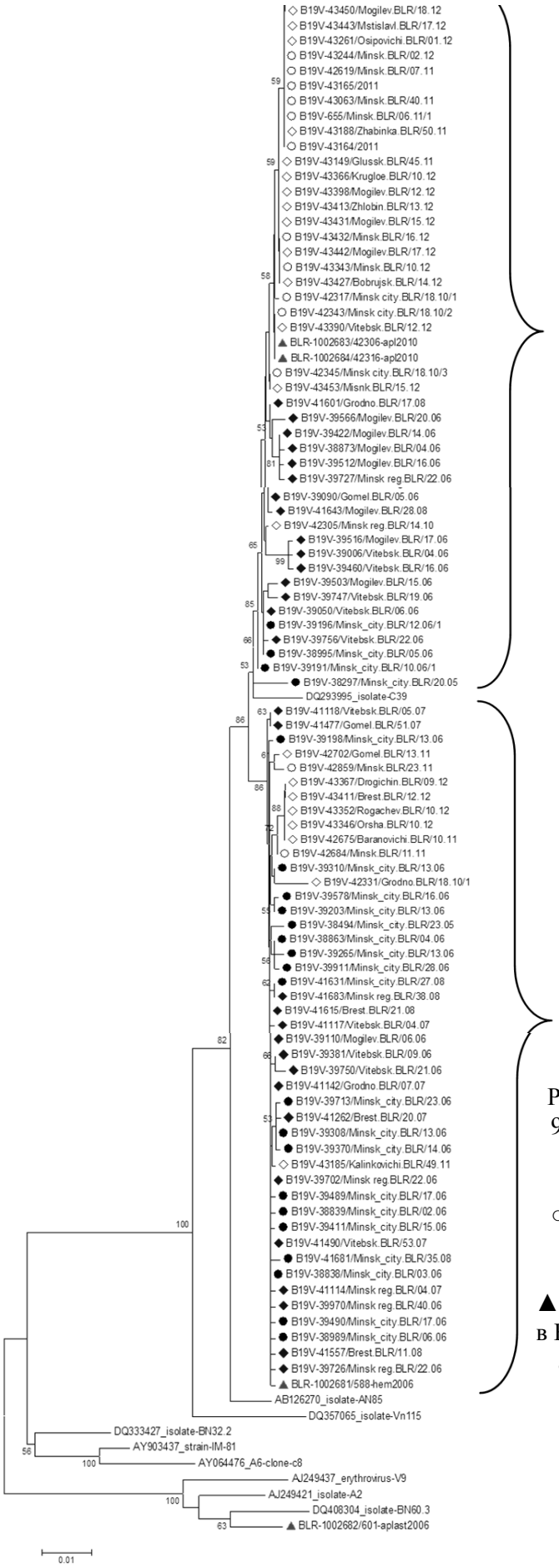
На филогенетическом древе штаммы генотипа 1 формировали два кластера (кластер 1 и кластер 2). В 2005–2008 гг. преимущественное распространение в стране имели вирусы кластера 1. К этому кластеру принадлежали штаммы из вспышки парвовирусной инфекции в г. Минске в 2006 г., а также большинство вирусов, выявленных в Брестской, Гродненской, Витебской, Гомельской областях, в т. ч. из регистрировавшихся там в 2007–2008 гг. ограниченных вспышек парвовирусной инфекции. Кластер 2 формировали преимущественно парвовирусы, циркулировавшие в Могилевской области в 2005 и 2008 гг., а также единичные штаммы из других регионов страны.

После 2009 г., когда наблюдался наиболее низкий за период 2005–2012 гг. уровень заболеваемости парвовирусной инфекцией, число лабораторно подтвержденных случаев начало возрастать во всех регионах страны. В период 2010–2011 гг. от заболевших были получены парвовирусы B19, принадлежавшие к обоим кластерам, при этом большинство (9/11; 81,8%) штаммов из г. Минска относилось к кластеру 2, а штаммы, полученные в других регионах страны, группировались как с кластером 1, так и 2. В 2012 г. в стране также циркулировали парвовирусы B19 кластеров 1 и 2, при этом все выявленные в г. Минске штаммы группировались только в кластере 2. Парвовирусы из Могилевской области также принадлежали только к кластеру 2, вирусы из других регионов страны относились к обоим кластерам.

**Выводы.** Результаты филогенетического анализа парвовирусов B19, выявленных в стране в период 2005–2012 гг., свидетельствуют о стабильной циркуляции на территории Беларуси парвовирусов B19 генотипа 1. На филогенетическом древе эти вирусы группировались в два кластера. Ежегодно в стране выявлялись вирусы каждого из кластеров, однако их территориальное распределение изменялось.

В последние годы произошла смена доминирующего в стране варианта парвовируса B19: если до 2010 г. основное распространение имели вирусы кластера 1, а кластер 2 был представлен преимущественно штаммами из Могилевской области, то в 2011–2012 гг. вирусы кластера 2 получили широкое распространение во всех регионах страны.

Ни одного парвовируса генотипа 3 от постоянно проживающих в Беларуси лиц с парвовирусной инфекцией (как от пациентов с инфекционной эритемой, так и от лиц с апластической анемией) за период 2005–2012 гг. получено не было. Выявленный у прибывшего из Казахстана пациента парвовирус B19 генотипа 3 оказался единственным вирусом этого генотипа за весь период наблюдения. Хотя данные о циркулирующих на территории Казахстана парвовирусах в литературе отсутствуют, известно, что именно генотип 3 распространен в соседнем с ней Киргизстане [3]. На основании данных филогенетического анализа случай апластического криза у пациента из Казахстана был классифицирован как завозной.




Кластер 1

Кластер 2

Рисунок — Филогенетическое древо на основе 994 н.о. NS1/VP1u региона парвовирусов B19, циркулировавших в Беларуси (● г. Минск 2005–2008 гг.; ○ г. Минск 2010–2012 гг.; ♦ — другие регионы страны 2005–2008 гг.; ◊ — другие регионы страны 2010–2012 гг.; ▲ — апластический криз у детей, проживающих в Беларуси, и у пациента из Казахстана (№6 01)), а также референс-штаммов парвовируса B19 генотипов 1, 2 и 3

**Литература**

1. Brown, K.E. Detection and quantitation of parvovirus B19 / K.E. Brown // J. Clin. Virol. — 2004. — Vol. 31. — P. 1–4.
2. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes / A. Servant [et al.] // J. Virol. — 2002. — Vol. 76. — P. 9124–9134.
3. Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b / J.M. Hübschen [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2009. — Vol. 47. — P. 3735–3738.
4. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2011. — Vol. 28. — P. 2731–2739.
5. Human parvovirus B19 surveilance in patients with rash and fever from Belarus / M. A. Yermalovich [et al.] // J. Med. Virol. — 2012. — Vol. 84. — P. 973–978.

## DISTRIBUTION OF DIFFERENT GENETIC VARIANTS OF PARVOVIRUS B19 IN BEALRUS DURING 2005–2012

**Yermalovich M.A.[1], Semeiko G.V.[1], Samoilovich E.O.[1], Babenko A.S.[2], Chernovetsky M.A.[2]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*
*[2]Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology & Immunology, Minsk, Belarus*

Phylogenetic analysis of 139 strains of parvovirus B19 isolated in Belarus in 2005–2012 revealed 138 of them belonged to genotype 1 and one — to genotype 3. Genotype 1 strains formed two different clusters (1 and 2) and annually the strains of both clusters were isolated in the country. Before 2010 cluster 1 dominated all over the country, but cluster 2 had only limited spreading in Mogilev region. Last years a replacement of dominated variant was observed with wide distribution of cluster 2 in all regions of the country. The only parvovirus B19 of genotype 3 had an imported origin and was isolated in 2006 from patient with aplastic crisis came from Kazakhstan.

**Keywords:** Parvovirus B19, genotype, genetic variant.

Поступила 06.09.2013

## ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА КОРИ ГЕНОТИПА B3 НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

**Ермолович М.А.[1], Семейко Г.В.[1], Свирчевская Е.Ю.[1], Самойлович Е.О.[1], Блатун Е.М.[2], Карпов И.А.[3]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*
*[2]Городская клиническая инфекционная больница;*
*[3]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** На заключительном этапе выполнения Программы ликвидации кори и краснухи обязательным является лабораторная верификация каждого случая заболевания, а также молекулярно-генетическое изучение возбудителя для установления его происхождения. В июле 2013 г. заболевание корью было подтверждено у пациента, прибывшего в Минск из ОАЭ. При вирусологическом обследовании был выявлен вирус кори генотипа B3, ранее никогда не обнаруживавшийся в Беларуси и имеющий в настоящее время широкое распространение в странах Ближнего Востока. Полученные молекулярно-генетические данные позволили подтвердить эпидемиологическую информацию о завозном характере выявленного случая кори.

**Ключевые слова:** корь, вирус кори, генотип.

**Введение.** В настоящее время Республика Беларусь находится на заключительно этапе выполнения Программы ликвидации кори и краснухи, координируемой ЕРБ ВОЗ. Ликвидация инфекции подразумевает отсутствие эндемичной циркуляции возбудителя на большой географической территории, однако при этом не исключается выявление там завозных случаев заболевания. В условиях

низкого уровня заболеваемости определяющая роль в оценке распространения инфекции принадлежит лабораторным исследованиям, которые позволяют подтвердить или исключить случай заболевания, а так же установить его происхождение.

С 2004 г. эндемичная циркуляция вируса кори на территории Беларуси отсутствует, а все 223 зарегистрированные в этот период случаи кори были классифицированы как завозные или связанные с завозными. Филогенетический анализ показал принадлежность выделенных от заболевших вирусов к генотипам D4, D5, D6, D8, D9, и во всех случаях позволил подтвердить эпидемиологические данные о завозе инфекции из России, Украины, Таиланда, Египта, Индии.

В июле 2013 г. в инфекционную больницу г. Минска был госпитализирован житель Беларуси, временно проживающий в ОАЭ и вернувшийся оттуда накануне начала заболевания. Клинические симптомы были слабо выражены, однако наличие субфебрильной лихорадки и макуло-папулезной сыпи, имевшей этапное распространение, позволило заподозрить корь и потребовало лабораторного обследования пациента.

**Материалы и методы.** Для выявления специфических антител были исследованы сыворотки крови, забранные на 2, 5 и 8 дни от появления сыпи. Для вирусологического исследования использовали образец носоглоточного смыва, забранного на второй день от появления сыпи.

Наличие IgM и IgG антител к вирусу кори определяли в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих наборов производства Siemens, Германия. РНК выделяли из 140 мкл образца с помощью набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Амплификацию фрагмента генома вируса кори, используемого для генотипирования, проводили методом гнездовой ПЦР с использованием описанных в литературе праймеров [1]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Секвенирование выполняли с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе 3100 Avant (Applied Biosystems, США).

**Результаты и их обсуждение.** В первом образце крови, забранном на второй день от появления сыпи, специфические IgM антитела отсутствовали. Во втором образце, полученном на 5 день появления сыпи, IgM антитела были выявлены, однако их оптическая плотность соответствовала «серой зоне». Такие серологические результаты требуют исследования еще одного образца крови. В третьем образце крови данного пациента уровень IgM антител соответствовал их содержанию во втором образце. Согласно рекомендациям производителя диагностического набора, повторное выявление IgM антител в концентрации, соответствующей «серой зоне», следует рассматривать как показатель наличия инфекции, однако в такой ситуации важным является получение и других лабораторных данных, свидетельствующих об инфицировании вирусом кори.

При исследовании парных сывороток крови в первом образце был обнаружен высокий уровень специфических IgG антител (9 000 мМЕ/мл), что, как правило, нехарактерно для первичного инфицирования вирусом кори. Однако во втором образце их уровень возрос в два раза (18 000 мМЕ/мл) в сравнении с первым образцом, что считается диагностически значимым и подтверждает наличие инфекции.

Подобную серологическую картину коревой инфекции (низкое содержание специфических IgM антител, быстрое нарастание концентрации IgG антител в первые дни заболевания) наблюдали в последние годы и другие исследователи у пациентов, привитых против кори много лет назад и не имеющих достаточного защитного уровня антител вследствие неполного или неадекватного курса вакцинации [2]. В представленном случае сведения о вакцинации заболевшего отсутствовали, однако по возрасту он мог получить одну прививку против кори в детстве, поскольку в тот период в стране была принята однодозовая схема вакцинации. Как известно, в настоящее время адекватной вакцинацией против кори считается получение двух доз вакцины [3].

Для подтверждения диагноза большое значение имело также вирусологическое обследование пациента. В образце носоглоточного смыва была выявлена РНК вируса кори, что позволило дополнительно подтвердить правомерность диагноза корь. Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента N-гена показал, что полученный вирус относится к генотипу B3. Вирусы этого генотипа никогда ранее не выявлялись на территории Беларуси, и описанный случай является первым случаем завоза генотипа B3 в страну. В последние годы основным ареалом распространения генотипа B3 являются страны Ближнего Востока (в частности Иран, Египет, Оман, Израиль, Ливан), где им обу-

словлено более 95% зарегистрированных случаев. Таким образом, молекулярно-генетические данные позволили подтвердить эпидемиологическую информацию о завозе кори из ОАЭ.

**Выводы.** Представленные данные свидетельствуют об исключительной важности как серологического, так и вирусологического обследования пациентов с подозрением на корь на заключительном этапе ликвидации инфекции. Наряду с обязательным выявлением IgM антител, большое значение для верификации диагноза также имеет определение IgG антител в парных сыворотках. Вирусологическое обследование должно проводиться для каждого заболевшего, поскольку его данные не только позволяют подтвердить диагноз, но также играют решающую роль в установлении происхождения возбудителя.

**Литература**

1. Genotyping of recent measles virus strains from Russia and Vietnam by nucleotide-specific multiplex PCR / J.R. Kremer [et al.] // J. Med. Virol. — 2007. — Vol. 79. — P. 987–994.
2. Особенности лабораторной диагностики коревой инфекции у ранее вакцинированных и невакцинированных пациентов / Т.А. Мамаева [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2012. — № 57. — С. 21–26.
3. Regional office for Europe. Eliminating measles and rubella and preventing of congenital rubella infection: WHO European Region strategic plan 2005–2010. — Copenhagen, 2005.

## FIRST CASE OF DETECTION OF GENOTYPE B3 MEASLES VIRUS IN BELARUS

**Yermalovich M.A.[1], Semeiko G.V.[1], Svirchevskaya E.Y.[1], Samoilovich E.O.[1], Blatun E.M.[2], Karpov I.A.[3]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]City Clinical Hospital of Infectious Disease;*

*[3]Belarus State Medical University, Minsk, Belarus*

Final stage of the Program of Measles and Rubella Elimination required a laboratory confirmation of each cases and molecular-genetic investigation of etiologic virus for establishment of its origin. In July 2013 a measles case was confirmed in patient came to Minsk from the United Arab Emirates. Measles virus of genotype B3 was revealed. This genotype has never been found in Belarus earlier. Currently B3 genotype has wide distribution in the Middle East countries. Molecular data allowed confirming epidemiological information about importation of the measles case.

**Keywords:** measles, measles virus, genotype.

Поступила 06.09.2013

## ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ КОКЛЮШНОГО ТОКСИНА И ПЕРТАКТИНА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *BORDETELLA PERTUSSIS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ

**Колодкина В.Л., Мартынов В.С.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Одной из причин возрождения коклюша является распространение и доминирование в популяции циркулирующих *B. pertussis*, штаммов генетически отличающихся от вакцинных штаммов. Проведен молекулярно-генетический анализ структуры S1субъединицы коклюшного токсина и гена пертактина у клинических изолятов *B. pertussis*, изолированных от больных коклюшем в Республике Беларусь в 2011–2012 гг. При секвенировании *ptxA* гена, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина, выявлен один вариант последовательности нуклеотидов, который соответствовал в базе данных генотипов *ptxA*1 аллелю гена, и два варианта последовательности нуклеотидов *prn* гена, кодирующего пертактин, которые соответствовали одному из двух аллелей — *prn* 2 или *prn* 1. Два вакцинных штамма продуцируют *ptxA*2 и один штамм — *ptxA*4 варианты гена *ptxA* и все три штамма продуцируют вариант гена пертактина *prn* 1. Полученные данные свидетельствуют, что

штаммы *B. pertussis*, циркулирующие в стране, имеют новую генетическую структуру, детерминирующую такие важные факторы вирулентности как S1 субъединицу коклюшного токсина и фактор адгезии возбудителя на поверхности чувствительного эпителия. Анализ полиморфизма в других генах *B. pertussis* остается важной областью исследования, что позволит идентифицировать эволюционные изменения возбудителя коклюша, которые способствуют его сохранению и циркуляции в популяции привитых лиц.

**Ключевые слова:** *Bordetella pertussis*, секвенирование, ген.

**Введение.** Во многих странах Европы и Америки с высоким уровнем охвата профилактическими прививками с 1990-х гг. отмечается рост заболеваемости коклюшем, который стал наиболее высоким среди вакциноуправляемых инфекций [1]. Одной из причин возрождения коклюша, согласно данным Mooi et al. [2], является распространение и доминирование в популяции циркулирующих *B. pertussis*, штаммов генетически отличающихся от вакцинных штаммов. В Республике Беларусь иммунопрофилактика против коклюша была начата с 1958 г. коклюшно-дифтерийной (КД) вакциной. В начале 60-х гг. стали применять коклюшно-дифтерийно-столбнячную (КДС), а затем — АКДС вакцину. Введение вакцинации существенным образом снизило заболеваемость в стране, однако случаи заболевания продолжают регистрироваться, несмотря на высокий охват иммунизацией детей. В довакцинальный период (1945–1957 гг.) среднемноголетний показатель составлял 134,7 на 100 тыс. населения, в 2011 г. он снизился до 1,58, а в 2012 г. составил 6,06 на 100 тыс. населения. Наиболее высокой заболеваемость сохраняется среди детей первых двух лет жизни. Согласно статистическим данным МЗ РБ, удельный вес этой возрастной группы в целом по стране за исключением 1996–1998 гг. колеблется от 40,4 (1999) до 68,8% (2007) среди общего числа случаев коклюша.

Коклюшный токсин и Р.69/пертактин являются основными факторами вирулентности возбудителя коклюша и антитела, образуемые к этим белкам в ответ на введение клеточных и бесклеточных вакцин, являются протективными [3–6]. Изучение степени антигенной вариабельности в этих белках является важным для оценки эффективности используемых вакцин.

**Целью** исследования явился молекулярно-генетический анализ структуры S1 субъединицы коклюшного токсина и гена пертактина клинических изолятов *B. pertussis*, изолированных в Республике Беларусь.

**Материалы и методы.** Амплификацию в ПЦР и последующее секвенирование генов *s1* и *prn* проводили в соответствии с рекомендациями Mooi F. et al. (1998, 2000) с модификацией реакционной смеси [2, 7]. Полноразмерное секвенирование гена *ptxA* и секвенирование двух полиморфных регионов гена пертактина проведено у восьми клинических изолятов *B. pertussis*, изолированных в Республике Беларусь в 2011–2012 гг. от больных коклюшем с последующей идентификацией аллельного профиля каждого штамма.

**Результаты и их обсуждение.** Среди анализируемых штаммов *B. pertussis* при секвенировании *ptxA* гена, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина, выявлен один вариант последовательности нуклеотидов, который соответствовал в базе данных генотипов *ptxA*1 аллелю гена, и два варианта последовательности нуклеотидов *prn* гена, кодирующего пертактин, которые соответствовали одному из двух аллелей — *prn* 2 или *prn* 1.

АКДС-вакцина (производства России), используемая в нашей стране для иммунизации детского населения с конца 60-х гг., содержит в составе цельноклеточный коклюшный компонент, состоящий из трех штаммов *B.pertussis* различных серотипов. По данным Борисовой О.Ю. с соавт. (2007), два вакцинных штамма продуцируют *ptxA*2 и один штамм — *ptxA*4 варианты гена *ptxA* и все три штамма продуцируют вариант гена пертактина *prn* 1 [8]. В результате исследования установлено, что по структуре *ptxA* гена все восемь штаммов *B. pertussis* несли новую структуру гена, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина — основного токсического компонента возбудителя коклюша. По структуре *prn* гена, кодирующего фактор адгезии возбудителя на поверхности чувствительного эпителия, семь штаммов имели новый невакцинный *prn* 2 аллель гена, и только один штамм имел старый «вакцинный» *prn* 1 аллель гена.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют, что штаммы *B.pertussis*, циркулирующие в стране, имеют новую генетическую структуру, детерминирующую такие важные факторы вирулентности как S1 субъединицу коклюшного токсина и фактор адгезии возбудителя на поверхности чувствительного эпителия.

**Литература**

1. www.who.int/ru.
2. Polymorphism in the Bordetella pertussis virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution / F. Mooi [et al.] // Infect. Immun. — 1998. — Vol. 66. — P. 670–675.
3. Zackrisson, G. History of whooping cough in nonvaccinated Swedish children, related to serum antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin / G. Zackrisson, J. Taranger, B.Trollfors // J. Pediatr. — 1990. — Vol. 116. — P. 190–194.
4. Cherry, J.D. A search for immunity to illnesses serologic correlates of Bordetella pertussis cough illnesses / J.D. Cherry [et al.] // Vaccine. — 1998. — Vol. 16. — P. 1901–1906.
5. Storsaeter, J. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to Bordetella pertussis / J. Storsaeter [et al.] // Vaccine. — 1998. — Vol. 16. — P. 1907–1916.
6. Trollfors, B. A placebo-controlled trial of pertussis-toxoid vaccine / B.Trollfors [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 333. — P. 1045–1050.
7. Mooi, F. Epidemiological Typing of Bordetella pertussis Isolates: Recommendations for a Standard Methodology / F. Mooi [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 19. — P. 174–181.
8. Borisova, O. Antigenic Divergence between Bordetella pertussis Clinical Isolates from Moscow, Russia, and Vaccine Strains / O. Borisova [et al.] // Clin. Vac. Immunol. — 2007. — Vol. 14, № 3. — P. 234–238.

## DESCRIPTION OF BORDETELLA PERTUSSIS VIRULENCE FACTORS PERTUSSIS TOXIN AND PERTACTIN IN CLINICAL ISOLATES IN BELARUS

**Kolodkina V.L., Martinov V.S.**

*Research and Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus*

The reemergence of pertussis has been reported in several countries despite high vaccination coverage. One possible explanation for this resurgence, is the expansion of strains of *B. pertussis* antigenically distinct from those in the vaccine. We have investigated polymorphism in the genes coding for two important virulence factors of *B. pertussis*, pertussis toxin and pertactin and identified the emergence and subsequent dominance of toxin and pertactin variants not found in the whole-cell vaccine (WCV). Sequence analysis of the genes for the pertussis toxin S1 subunit (*ptxA*) and pertactin (prn) among isolates of *B. pertussis* from 8 Belarus patients, revealed one *ptxA*1 variant and two prn variants, *prn* 2 (7 strains), *prn* 1 (1 strain), showing differences in nucleic acid sequence. The three strains used for the whole-cell vaccine harbored the alleles *ptxA*2, *ptxA*4 and *prn*1. Analysis of polymorphism in *B. pertussis* genes other than those investigated here remain an important area of research. Such analysis will allow the identification of the evolutionary changes in *B. pertussis* which allow it to persist in immunized population.

**Keywords:** *Bordetella pertussis*, sequencing, gene.

Поступила 02.09.2013

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО КОКЛЮШУ В БЕЛАРУСИ В 2012 Г.

**Колодкина В.Л., Мартынов В.С.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Среди 569 случаев коклюша зарегистрированных в стране в 2012 г. большинство (85,4%) были лабораторно подтвержденными, 2,1% случаев имели эпидемиологическую связь с лабораторно подтвержденными случаями коклюша и в 12,5% случаев диагноз поставлен клинически. Доля лабораторно подтвержденных случаев коклюша бактериологическим методом составила (1,0%), в ПЦР — (45,7%), в ИФА — (40,6%), в РА — (12,7%). Заболеваемость коклюшем регистрировалась во всех возрастных группах, включая детей, подростков и взрослых. Наибольшее число случаев (471 из 569) зарегистрировано среди детей в возрасте от 1 мес. до 9 лет. Доля заболевших в возрасте до года составила 26,2%, в группе 1–4 года — 26,3% , в группе 5–9 лет — 30,2%. Среди заболевших коклюшем в возрасте до года наибольшую долю 61,7% составляли младенцы первых четырех месяцев жизни, не успевшие получить ни одной прививки против коклюша. Несмотря на то, что не привитые младенцы находятся в группе повышенного риска заболевания коклюшем, прове-

дение ревакцинаций против коклюша среди подростков и взрослых является, по-видимому, решающим в контроле за инфекцией.

**Ключевые слова:** коклюш, заболеваемость, эпидемиология.

**Введение.** Введение вакцинации против коклюша и достижение высокого охвата прививками в большинстве развитых странах привело к существенному изменению эпидемиологии данной инфекции. С введением вакцинации в Республике Беларусь заболеваемость коклюшем снизилась существенным образом. Если в довакцинальный период (1945–1957 гг.) среднемноголетний показатель заболеваемости составлял 134,7 на 100 тыс. населения, то в 2011 г. он снизился до 1,58 на 100 тыс. Однако, несмотря на поддержание программ иммунизации в последние два десятилетия отмечается возрождение коклюшной инфекции во многих странах. Рост заболеваемости коклюшем отмечается во всех возрастных группах, с наибольшей регистрацией случаев среди младенцев, которые не успели еще получить первичный курс иммунизации, так как не достигли возраста в соответствии с календарем прививок [1, 2]. Во многих странах в настоящее время коклюш превосходит по уровню заболеваемости все вакциноуправляемые инфекции [3]. Также установлено что, коклюшеподобные заболевания могут вызываться другими микроорганизмами, такими как *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* и *Adenovirus* [4]. Кроме того, атипичное течение заболевания отмечается среди подростков и взрослых [5]. В связи с этим диагностика коклюша, особенно в популяции привитых лиц, должна основываться на лабораторном подтверждении как для пациентов, так и для мониторинга программы иммунизации.

**Целью** настоящего исследования явился анализ случаев коклюша, зарегистрированных в Республике Беларусь в 2012 г. с учетом данных лабораторного подтверждения.

**Материалы и методы.** Проведен анализ 569 случаев коклюша из 576 зарегистрированных в стране в 2012 г. в соответствии с представленными картами эпидемиологического расследования.

Лабораторная диагностика коклюшной инфекции включала исследование носоглоточных мазков и сывороток крови от больных с подозрением на коклюш, которые проводились в лаборатории вакциноуправляемых инфекций РНПЦ ЭМ. Носоглоточные мазки исследовались с использованием бактериологического метода и полимеразной цепной реакции (ПЦР), разработанной в лаборатории для выявления ДНК возбудителей коклюша и паракоклюша [6]. Серологическая диагностика коклюша основывалась на выявлении в иммуноферментном анализе (ИФА) диагностического титра IgG к коклюшному токсину, при использовании одной сыворотки крови или на 4-кратном нарастании титров антител в парных сыворотках, используя ИФА или реакцию агглютинации (РА), выявляющую антитела, индуцированные агглютиногенами возбудителей, находящихся в I фазе. РА проводилась на базе бактериологических лабораторий страны.

**Результаты и их обсуждение.** Среди 569 зарегистрированных случаев коклюша клинически диагноз поставлен у 71 пациента (12,5%), 12 случаев (2,1%) имели эпидемиологическую связь с лабораторно подтвержденными случаями коклюша. Остальные 486 случаев (85,4%) были лабораторно подтвержденными соответственно бактериологическим методом (1,0%), в ПЦР (45,7%), в ИФА (40,6%), в РА (12,7%). Заболеваемость коклюшем регистрировалась во всех возрастных группах, включая детей, подростков и взрослых. Наибольшее число случаев зарегистрировано среди детей в возрасте от 1 мес. до 9 лет. Доля заболевших в возрасте до года составила 26,2% (149 из 569), в группе 1–4 года — 26,3% (150 из 569), в группе 5–9 лет — 30,2% (172 из 569). Среди заболевших коклюшем в возрасте до года наибольшую долю 61,7% (92 из 149) составляли младенцы первых четырех месяцев жизни, не успевшие получить ни одной прививки против коклюша. В возрастных группах 10–14 лет, 15–19 и 20–50 лет и старше доля заболевших колебалась от 13 до 0,2%.

**Выводы.** Несмотря на то, что не привитые младенцы находятся в группе повышенного риска заболевания коклюшем, проведение ревакцинаций против коклюша среди подростков и взрослых является, по-видимому, решающим в контроле за инфекцией.

**Литература**

1. Celentano, L. Resurgence of Pertussis in Europe / L. Celentano [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. — 2005. — Vol. 24. — P. 761–765.

2. Edwards, K.M. Pertussis epidemiology and transmission (a review) / K.M. Edwards // Adv. Stud. Med. — 2005. — Vol. 5 (5A). — P. 440–443.

3. Heininger, U. Pertussis immunisation in adolescents and adults - Bordetella pertussis epidemiology should guide vaccination recommendations (a review) / U. Heininger, J. D.Cherry // Exp. Opin. Biol. Ther. — 2006. — Vol. 6. — P. 685–697.

4. von Konig, C.H. A serological study of organisms possibly associated with pertussis-like coughing / C.H. von Konig [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. — 1998. — Vol. 17. — P. 645–649.

5. Edwards, K.M. Adolescent and adult pertussis: disease burden and prevention / K.M. Edwards, D.M. Freeman // Curr. Opin. Pediatr. — 2006. — Vol. 18. — P. 77–80.

6. Выявление *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis* в мазках из носоглотки методом ПЦР / В.Л. Колодкина [и др.] // Здравоохранение. — 2010. — № 10. — С. 66–70.

## THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF PERTUSSIS IN BELARUS IN 2012

**Kolodkina V.L., Martinov V.S.**

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

The majority of the 569 cases notified to analysis department in 2012 year were laboratory confirmed (85.4%), 2.1% fulfilled the clinical case definition and were epidemiologically linked to a laboratory confirmed case and 12.5% solely fulfilled the clinical case definition. Of the laboratory confirmed cases, 5 (1.0%) were diagnosed by culture, 222 (45.7%) by PCR, 197 (40.6%) by ELISA test, and 62 (12.7%) by BA test.

The incidence of whooping cough recorded in all age groups, including children, adolescents, and adults. The largest number of cases reported among children aged 1 month to 9 years. The share of cases among children younger than one year was 26.2% (149 of 569) in the group of 1–4 years — 26.3% (150 of 569) in the group of 5–9 years — 30.2% (172 of 569). Among children under one year was a high proportion of cases in infants aged 1–4 months. They accounted for 61.7% (92 of 149) of the cases. All patients in this group of infants received no vaccination against pertussis. The proportion of cases among persons 10–14 years, 15–19 years and adults 20–50 years of age and older was respectively 13.0, 1.8 and 2.5%.

Although infants remain the most at risk for severe, life-threatening disease, it is adolescent and adult booster immunisation which remains critical for prevention programs.

**Keywords:** Pertussis (whooping cough), Incidence of infection, epidemiology.

Поступила 02.09.2013

## КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАКРЫТОМ КОЛЛЕКТИВЕ

**Курятников А.Г.**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Исследования проводились на 130 осужденных ВИЧ-инфицированных женщин. Наиболее часто оппортунистические инфекции встречались в возрастных группах 30–34 года и 35–39 лет и преобладала такая патология, как кандидозный вульвовагинит (42,3%) и онихомикоз (30%) при стаже ВИЧ-инфекции от 5 до 14 лет. Среди общей патологии преобладала бронхо-легочная патология — 86,92%. Отсутствие заболеваемости туберкулезом среди лиц, получающих ВААРТ свидетельствует о высокой приверженности к лечению в условиях исправительных учреждений.

**Введение.** ВИЧ-инфекция является актуальной проблемой современной медицины [1–3]. Количество вновь выявленных случаев заболевания неуклонно возрастает, что переводит проблему из чисто медицинской плоскости в разряд медико-социальных проблем. В частности, социализация проблемы отчетливо прослеживается при анализе социально-демографических характеристик ВИЧ-инфицированных пациентов. Целый ряд факторов обуславливает рост ВИЧ-инфекции: внутривенное потребление наркотических средств [4, 5], ранние половые связи, беспорядочные половые контакты, гомосексуальные контакты [4].

Среди целевых групп высокого риска по инфицированию ВИЧ особую медико-социальную значимость представляют контингенты осужденных, поскольку концентрация ВИЧ-инфицированных в учреждениях УИС значительно выше, чем в других группах населения [1], так же как распространенность сопутствующих социально-значимых инфекций (туберкулез, вирусные гепатиты, ИППП и т. д.),

а высокий уровень рискованного поведения способствует передаче инфекции. Изучение ВИЧ инфекции в условиях закрытого коллектива является сложной проблемой, в силу особенностей контингента пациентов, их отношения к своему здоровья, наличия определенной стигмы у персонала. Однако, с другой стороны, в условиях закрытого коллектива все пациенты находятся под постоянным наблюдением доктора, что дает возможность четко проводить мониторинг при необходимости проведения лечения (в данном случае лечение ВИЧ инфекции).

В соответствие с действующим законодательством все ВИЧ-положительные осужденные содержатся на общих основаниях, т. е. вместе со всеми остальными осужденными.

В России ежегодно несколько сотен ВИЧ-инфицированных пациентов возвращаются из заключения в общество. При этом более половины из них после освобождения не встают на диспансерный учет. Охват диспансерным наблюдением ВИЧ-инфицированных осужденных после их освобождения является недостаточным, в то время как распространенность социально-значимых заболеваний и рискованного поведения, связанного с употреблением наркотиков и сексуальными контактами, среди них остается высокой [1].

Соответственно все это требует усиления работы по повышению приверженности лиц, освобождающихся после заключения, диспансерному наблюдению и ВААРТ.

Около 90% летальных случаев при ВИЧ-инфекции среди осужденных прямо или косвенно обусловлены оппортунистическими инфекциями, что подтверждает важную роль их своевременной профилактики и адекватного лечения [2].

**Цель работы:** изучить клинико-эпидемиологические особенности проявления и течения ВИЧ-инфекции среди лиц закрытого коллектива, принимающих ВААРТ, и ВИЧ-инфицированных осужденных, не принимающих ВААРТ.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено в период 2008–2013 гг. Проанализированы социально-демографические, клинические и лабораторно-инструментальные данные ВИЧ-положительных осужденных женщин, получающих ВААРТ, медкарты осужденных, которым ВААРТ не назначалась. Полученные результаты обработаны статистически с использованием методов параметрической статистики.

**Результаты и их обсуждение.** За период с апреля 2008 г. по июнь 2013 года наблюдалось 130 ВИЧ-положительных осужденных женщин различных возрастных групп из различных социальных слоев. В возрасте 20–24 лет было 5 человек (3,84%), 25–29 лет — 16 (12,3%), 30–34 года — 48 (36,92%), 35–39 лет — 35 (26,92%), 40–44 года — 18 (13,84%), 45 лет и старше — 8 (6,15%) человек. Таким образом, возраст 30–34 года встречался наиболее часто. ВААРТ была назначена 91 пациентке, что составило 70% от всех наблюдаемых. Отказались от старта ВААРТ 6 пациенток (4,61%), 33 осужденным (25,38%) ВААРТ не назначалась по разным причинам, как правило, из-за частого передвижения осужденных, малого срока и освобождения. Среди тех, кому была назначена ВААРТ, 4 пациентки (3,07%) проходили лечение по поводу туберкулеза органов дыхания. За период наблюдения с апреля 2008 г. по июнь 2013 г. ни одна из осужденных, принимая ВААРТ по схемам, согласно применяемой стратегии DOTS, не заболела туберкулезом легких. Среди 4 осужденных женщин, страдающих туберкулезом органов дыхания в прошлом, по состоянию на 01.06.2013 г. все были излечены и продолжают прием ВААРТ. В обследуемой группы (130 пациенток): 111 — инъекционные наркоманы, 19 — заразились половым путем. Лица, имеющие ХВГ (103 пациентки, 79,23%), относятся к группе инъекционных наркоманов.

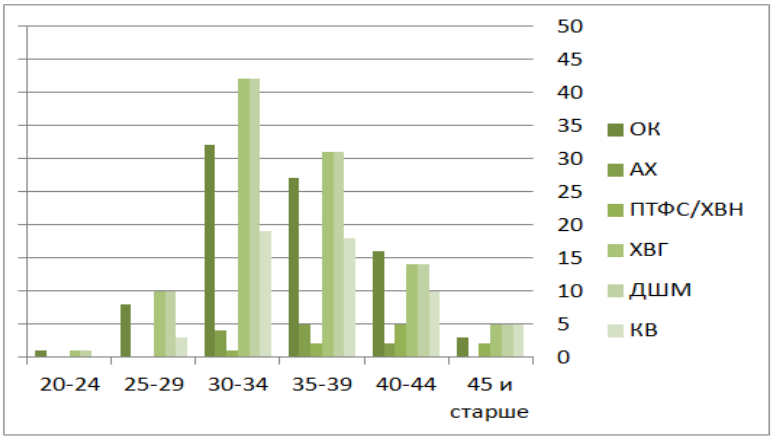
Стаж ВИЧ-инфекции представлен в таблице 1. У 43 обследованных (33,07 %) стаж заболевания был максимальным (10–14 лет).

Таблица 1 — Распределение стажа ВИЧ-инфекции по возрастным группам

| Стаж ВИЧ | Годы | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Менее 5 лет | 5–9 | 10–14 | 15 и более лет |
| Кол-во чел. (130), 100% | 25 (19,23%) | 40 (30,76%) | 43 (33,07%) | 22 (16,92%) |

На рисунке представлена частота регистрации оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных пациенток. Наиболее часто оппортунистические инфекции встречались в возраст-

ных группах 30–34 года и 35–39 лет. Характерно наличие вирусных гепатитов (причем преобладает ВГС), дисплазии шейки матки. Следует обратить внимание на высокую распространенность орофарингеального кандидоза, что является существенным критерием развивающейся иммунологической недостаточности. В целом следует отметить, что кожные поражения были ведущим признаком иммунодефицита. На лидирующем месте по встречаемости оказался онихомикоз — 30 % случаев, второе место заняли инфекция, вызванная Варицелла–Зостер вирусом, и метеодерматиты — по 12,3% соответственно.




Примечания: 1) ОК — орофарингиальный кандидоз; 2) АХ — ангулярный хейлит; 3) ПТФС/ХВН — посттромбофлебитический синдром/хроническая венозная недостаточность; 4) ХВГ — хронический вирусный гепатит (ХВГС — 69, ХВГВ+С — 12, ХВГВ — 19, ХВГ В+С+Д — 3); 5) ДШМ — дисплазия шейки матки; 6) КВ — кандидозный вульвовагинит.

Рисунок — Частота появления клинических состояний и оппортунистических инфекций в исследуемой группе

Следующими по значимости является патология верхних и нижних дыхательных путей. Хроническим бронхитом страдало 32,30% ВИЧ-инфицированных пациентов, что связано с курением в МЛС, а также образом жизни до осуждения. Вместе с тем, если учесть заболеваемость трахеитом и трахеобронхитом, эта цифра существенно возрастает (таблица 2). Следует обратить внимание на следующее важнейшее, с нашей точки зрения, обстоятельство. За период наблюдения с апреля 2008 г. по июнь 2013 г. ни одна из осужденных, принимая ВААРТ по схемам, согласно применяемой стратегии DOTS, не заболела туберкулезом легких.

Таблица 2— Частота бронхо-легочных заболеваний

| Кол-во чел. (130), 100% | Бронхо-легочное заболевание | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Трахеобронхит | Бронхит | Трахеит | Пневмония |
| | 28 (21,53%) | 42 (32,30%) | 36 (27,69%) | 7 (5,38%) |

В таблице 3 представлены данные, характеризующие распространенность ЛОР-патологии. Наиболее частыми в исправительном учреждении были фарингиты (20%), гаймориты (14,61%). Третье место делят по 11,53% отиты и синуситы. Лидирующее место фарингитов также можно связать почти с тотальным курением.

Таблица 3 — Частота ЛОР-патологии

| Кол-во чел., % | ЛОР-патология | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Фарингит | Отит | Ларингит | Гайморит | Ринит | Туботит | Синусит | Назо-фарингит |
| | 26 (20%) | 15 (11,53%) | 3 (2,3%) | 19 (14,61%) | 4 (3,07%) | 9 (6,92%) | 15 (11,53%) | 2 (1,53%) |

В целом по частоте развития заболеваний клиническая картина выглядит следующим образом. Заболевания бронхо-легочной системы имели место у 113 (86,92%), хронические вирус-

ные гепатиты — у 103 (79,23%) пациенток. Патология со стороны ЛОР-органов наблюдалась у 93 (71,53%), со стороны ЖКТ — у 83 (63,07%) пациенток. Кандидозный вульвовагинит был зарегистрирован у 55 (42,30%), заболевания со стороны мочевой системы — у 52 (40 %), онихомикоз — у 39 (30%), дисплазия шейки матки различных степеней тяжести — у 27 (20,76%), ангулярный хейлит — 11 (8,46%), состояние по поводу ПТФС/ХВН — у 10 (7,69%) пациенток.

**Выводы.** У ВИЧ-инфицированных пациенток наиболее часто оппортунистические инфекции встречались в возрастных группах 30–34 года и 35–39 лет с преобладанием в клинической структуре кандидозного вульвовагинита (42,3%) и онихомикоза — 30% при стаже ВИЧ инфекции от 5 до 14 лет. Среди общей патологии доминировали бронхо-легочные заболевания (86,92%). Отсутствие заболеваемости туберкулезом среди лиц, получающих ВААРТ, свидетельствует о высокой приверженности к лечению в условиях исправительных учреждений.

**Литература**

1. ВИЧ в тюрьмах: практ. пособие для петенциарных систем новых независимых государств / Ф. Алькабес [и др.]; ВОЗ. — Женева, 2001. — 311 с.
2. Факторы риска и профилактика ВИЧ-инфекции у женщин, употребляющих психоактивные вещества / Н.А. Должанская [и др.] // Вопр. наркологии. — 2000. — № 2. — С. 60–67.
3. Батлер, У.Э. ВИЧ/СПИД и злоупотребление наркотическими средствами в России. Программы снижения вреда и Российская правовая система / У.Э. Батлер. — Лондон, 2003. — 23 с.
4. Прохорова, Л. Наркотизм: уголовно-правовое и криминологическое исследование / Л. Прохорова. — СПб., 2002. — С. 30.
5. Профилактика ВИЧ-инфекции среди потребителей инъекционных наркотиков в г. Тольятти Самарской области, Россия / Т. Роудз [и др.]. — Лондон: Имперский колледж, 2001.
6. Взаимосвязь между факторами риска ВИЧ-инфекции в России и подтипами ВИЧ-1, выделенными в России в 1994–1997 / Н.Н. Ладная [и др.] // Тез. 12-я Всемирн. конф. по СПИДу, Женева, июль. 1998.
7. Бююль, А. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей: пер. с нем. / А. Бююль, П. Цёфель. — СПб., 2002. — 608 с.

## CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF HIV INFECTION AMONG CONVICTED PERSONS

**Kuryatnikov A.G.**

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

The aim of our research was to determine clinical and epidemiological features of manifestation HIV infection among convicted persons. Our research was carried out on 130 convicted HIV infected women.

The most frequent opportunistic infections were oropharyngeal and vaginal candidosis (42.3%), onychomycosis 30%, herpes zoster 12.3% and meteodermatitis 12.3%. The most frequent respiratory system's diseases were bronchitis 42 (32.30%), tracheitis 36 (27.69%), tracheobronchitis 28 (21.53%) and pneumonia 7 (5.38%). There were not any patients with pulmonary tuberculosis among HIV-infected who had been taking HAART on the regime approved by DOTS. The most frequent ENT-pathology were pharyngitis 26 (20%), antritis 19 (14.61%), otitis 15 (11.53%) and sinusitis 15 (11.53%). Among the general somatic diseases the most frequent pathology was respiratory system's diseases. The absence of pulmonary tuberculosis among convicted HIV-infected women who had been taking HAART on the regime approved by DOTS can be explained by extremely high treatment adherence in prison.

Поступила 04.09.2013

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОКИ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

**Мельников В.Л., Митрофанова Н.Н., Балашова Е.П.**

*Пензенский государственный университет медицинский институт, Пенза, Россия*

**Резюме.** Острые кишечные инфекции (ОКИ) остаются одной из самых актуальных медицинских и социально-экономических проблем. Целью работы являлось изучение клинико-

эпидемиологичнских особенностей течения ОКИ у лиц, госпитализированных в инфекционные отделения клиник в 2012 г. Анализ проводился на основе медицинской документации данного лечебно-профилактического учреждения (ЛПУ). Полученные результаты подчеркивают необходимость широкого внедрения молекулярно-генетических методов (ПЦР) диагностики в повседневную рутинную практику.

**Ключевые слова: о**стрые кишечные инфекции (ОКИ), заболеваемость, клиническая картина.

**Введение.** Острые кишечные инфекция, несмотря на успехи медицинской науки и практического здравоохранения, остаются одной из актуальных проблем современности. Ежегодно в мире, по данным Всемирной организации здравоохранения, регистрируется более 1 млрд диарейных заболеваний, умирает около 4 млн человек, из которых 65–70% дети до 14 лет [1]. Наибольшую угрозу ОКИ представляют для детей в связи с высоким уровнем заболеваемости и летальности среди них. По данным различных авторов, кишечные инфекции занимают 2–3-е место среди всех инфекционных заболеваний у детей [2].

Возбудителями кишечных инфекций могут быть различные бактерии, наиболее важное значение среди них занимают бактерии из семейства *Enterobacteriaceae* (сальмонеллы, шигеллы, эшерихии, иерсинии, а также клебсиеллы). Наряду с бактериями значительную роль в возникновении кишечной патологии человека играют энтеротропные вирусы [3]. Среди вирусов первое место по частоте заболеваний занимают ротавирусы, определяющие до 65–70% всех случаев диареи [4].

В течение последних лет на территории Пензенской области ежегодно регистрируется более 6 тыс. случаев заболевания острыми кишечными инфекциями.

Показатель заболеваемости находится в интервале от 352,4 (2005 г.) до 510,6 (2011 г.) на 100 тыс. населения. В 2011 г. в Пензенской области зарегистрировано 7066 случаев заболевания острыми кишечными инфекциями, показатель заболеваемости составил 510,6 на 100 тыс.

По отдельным нозологическим формам (сальмонеллез, шигеллез, острые кишечные инфекции установленной этиологии) уровень заболеваемости превысил средние показатели по Российской Федерации [5].

**Материалы и методы.** Для анализа клинической картины ОКИ детально проанализировано 100 архивных истории болезни за 2012 г. в возрасте от 4 до 90 лет, из которых 72 — женщины и 28 — мужчины; взрослых 57 человек, детей 43 человека, из которых девочек 25, мальчиков 18. Материалом исследования служили испражнения пациентов. В 97% случаях возбудитель был выявлен бактериологическим способом, серологическим — в 1%, метод ПЦР использовался в 2%.

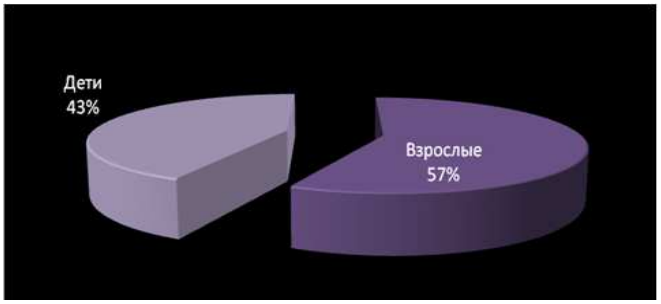



Рисунок 1 — Соотношение взрослых и детей среди больных ОКИ

У всех наблюдаемых больных при поступлении и в динамике болезни проводилось рутинное лабораторное обследование: клинический анализ крови, мочи и испражнений, по показаниям — биохимическое исследование крови.

**Результаты и их обсуждение.** Согласно анализу отчетов и историй болезни двух инфекционных отделений МУЗ ГКБ СМП им. Г.А.Захарьина в 2012 г. было пролечено 414 больных с ОКИ.

У подавляющего большинства больных этиологический значимый возбудитель был выявлен в ранний срок (1–3-й день госпитализации).

Среди взрослых гастроэнтериты невыявленной этиологии 60% и пищевые отравления составили 16%, преобладающее большинство ОКИ получило этиологическую расшифровку (24%).

Среди ОКИ установленной этиологии у взрослых присутствовали только моноинфекции (100%).

В структуре ОКИ острый гастроэнтерит стафилококковой этиологии (*S. aureus*) наблюдался в 14% случаев, сальмонеллез, вызванный *S. enteritidis,* — в 5%, сальмонеллез, вызванный *S. tiphi,* — 3%, острый гастроэнтерит норовирусной этиологии — 2%.

Рисунок 2 — Этиологическая структура ОКИ

Среди детей гастроэнтериты невыявленной этиологии составили 14% и пищевые отравления — 12%, преобладающее большинство ОКИ получило этиологическую расшифровку (74%).

Среди детских ОКИ установленной этиологии преобладали моноинфекции (60%), в структуре которых превалировали представители семейства *Enterobacteriaceae*, особенно бактерии рода *S. enteritidis*, являющиеся этиологическим агентом более, чем в 31% случаев ОКИ, *Shigella Flexneri* — 26%, *S. aureus* — 15%, норовирусы — 8%, роль *Pseudomonas aeruginosa* — 4%, *Edwardsiella* — 4%, протейной этиологии — 4%, ротавирусной этиологии — 4% и энтеробактериальной этиологии — 4% в структуре ОКИ была менее значимой.

Микст-инфекции встречались реже — в 14% случаев, из них преобладали сочетания норавирусной и ротавирусной инфекций — 33%, *P. aeroginosa* и норовируса — 17%, *P. aeroginosa* и ротавирусы — 17%, *Stahpyiococci* и норовирусы — 33%.

Большинство взрослых, перенесших ОКИ, находятся в возрастной категории от 18 до 25 лет (57%), от 26 до 35 лет — 21%, от 36 до 45 лет — 4%, от 46–55 лет — 2%, от 56–65 лет — 9%, от 66–75 лет — 2% и от 76–85 лет — 5%.

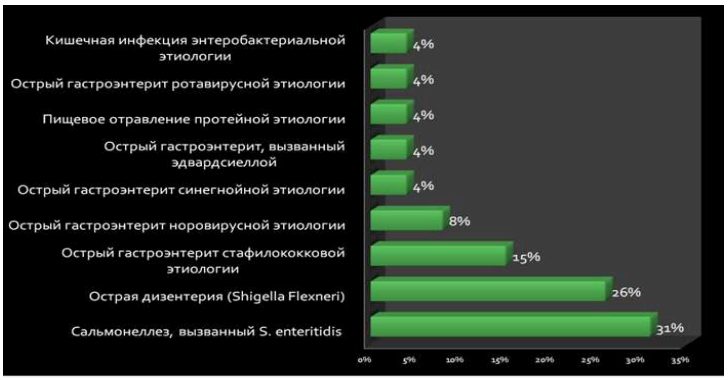



Рисунок 3 — Этиологическая структура кишечных моноинфекций

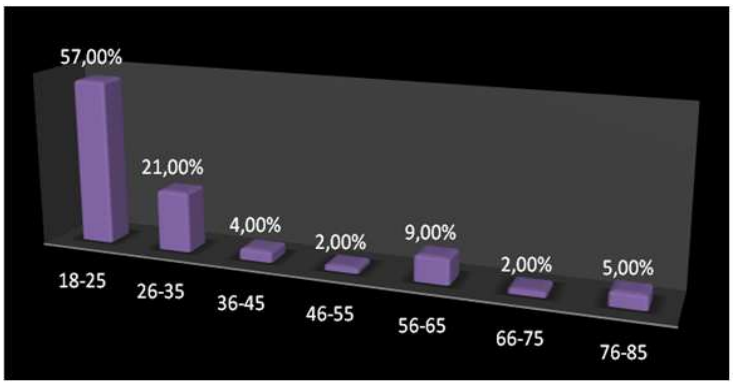



Рисунок 4 — Возрастная структура взрослых пациентов с ОКИ

Острыми кишечными инфекциями преимущественно болели дети от 2 до 5 лет, на долю которых пришлось более 40 % случаев. Дети более старших возрастных групп болели реже: от 6 до 9 лет — 28%, от 10 до 13 лет — 21%, от 14 до 18 лет — 11%.

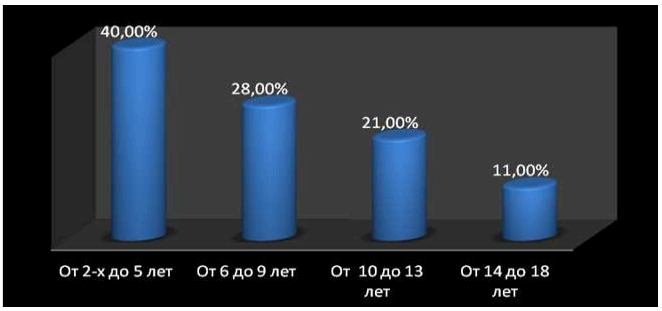



Рисунок 5 — Возрастная структура детей с ОКИ

В социальной структуре взрослых заболевших 46% относятся к работающему населению, 23% находятся в декретном отпуске, не работают 9%, пенсионеры и студенты составляют 19 и 3% соответственно. Контакты с больными отмечены в анамнезе у 30% больных.

По клинической форме ОКИ у взрослых чаще протекали по типу острого гастроэнтерита.

Ведущими клиническими симптомами заболеваний желудочно-кишечной системы являлись тошнота (88%), рвота (90%), жидкий стул (89%), гипертермия (93%), боли в животе, слабость (89%). Эти симптомы появлялись в большинстве случаев в первые дни заболевания одновременно. С 1 по 3-й день заболевания в стационар поступили 80% больных, позже 3-го дня от начала заболевания — 20%.

Важно заметить, что у части детей от 2 до 5 лет симтомы поражения желудочно-кишечного тракта сочетались с поражением респираторного тракта и появлялись одномоментно (37%).

У детей имело место следующее распределение нозологических форм по взрастным группам: инфекции по типу острого гастроэнтерита доминировали у всех детей.

Продолжительность госпитализации у взрослых составила от 3 до 11 дней (в среднем 8–9 дней). Продолжительность госпитализации у детей составила от 5 до 11 сут (в среднем 7–8 дней).

Следует отметить, что острые кишечные инфекции протекали в среднетяжелой форме (83%). В основном тяжелое течение у взрослых чаще отмечалось при гастроэнтеритах, являющихся моноинфекциями, вызванными *S. aureus* (57%). У 6% больных течение ОКИ характеризовалось развитием осложненений, проявляющихся в основном синдромами кетоацидоза — 3% случаев, токсико-эксикоза — 2%, реже – мальадсорбции (1%). Тяжелые формы заболеваний отмечались у 7% детей раннего возраста от 2 до 5 лет. Возникновение осложнений отмечалось у 4% детей данного возраста.

У больных ОКИ была отмечена средняя частота встречаемости сопутствующих заболеваний (15%) с преимущественным поражением сердечно-сосудистой системы. Существенно реже в качестве сопутствующих заболеваний были отмечены заболевания моче-половой системы (4%).

В общем анализе крови увеличение лейкоцитов было выявлено в 21% случаев, увеличение СОЭ — в 65%, увеличение нейтрофилов палочкоядерных — в 4%.

Больным, госпитализированным в данное ЛПУ, проводилась терапия следующего характера: только антибактериальная — 18% пациентов, только противовирусная — 2%, комбинированная — 80%.

Для антибактериальной терапии использовался один препарат у 12% человек, два — у 67% человек, три и более лекарственных средств — у 21% пациентов.

**Выводы.** Таким образом, в структуре острых кишечных инфекций преобладали моноинфекции, вызванные широким спектром микроорганизмом с преобладанием у взрослых в 100% случаях, детей — 60%. В основном болели дети в возрасте от 2 до 5 лет, взрослые в возрасте от 18 до 25 лет, с преобладанием гастроэнтерита, имеющих среднетяжелое течение, — 83%.

Острые кишечные инфекции с тяжелым течением имели место в основном среди детей от 2 до 5 лет и были вызваны сочетанием синегнойной палочки и норовируси и синегнойной палочки и ротавируса.

Отмечен значительный уровень осложнений — 6%, у 15% больных были выявлены сопутствующие заболевания.

**Литература**

1. Акимкин, В.Г. Эпидемиологический надзор за внутрибольничными инфекциями и система социально-гигиенического мониторинга / В.Г.Акимкин // Гигиена и санитария. — 2004. — № 5. — С. 19–22.

2. Сергевнин, В.И. Эпидемиологическое обследование очага острых кишечных инфекций с единичным заболеванием / В.И. Сергевнин // Журн. микробиол. — 2003. — № 5.— С. 77–81.

3. Рожнова, С.Ш. Эпидемиологическая ситуация по сальмонеллезам в России на рубеже веков / С.Ш. Рожнова, Т.И. Фролочкина, М.А. Головинова // Материалы VIII Всерос. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — М., 2002. — С. 91–92.

4. Эпидемиологическое расследование вспышек острых кишечных инфекцией: основные принципы повседневной практики / Л.Н. Берглезова [и др.] // Журн. микробиол. — 2000. — № 5. — С. 117–120.

5. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Пензенской области в 2011 г.». — Пенза, 2012. — 310 с.

## EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICAL CHARACTERISTIC OF THE ACUTE INTESTINAL INFECTION IN THE TERRITORY OF PENZA REGION.

**Melnikov V.L., Mitrofanova N.N., Balashova E.P.**

*Penza State University, Medical Institute, Penza, Russia*

Acute intestinal infection remains one of the most urgent health and socio-economic problems. The aim of the work was to study the clinical and epidemiological characteristics of the course of the acute intestinal infection in patients hospitalized in the infectious clinic in 2012. The analysis was conducted on the basis of medical documentation of this medical facility. The results underscore the need for a large-scale introduction of molecular genetic diagnostic methods (PCR) in daily routine practice.

**Keywords:** acute intestinal infection, incidence, clinical presentation.

Поступила 06.09.2013

## МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ НОРОВИРУСОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

**Поклонская Н.В.[1], Амвросьева Т.В.[1], Дедюля К.Л.[1], Ходин Д.В.[2], Дашкевич А.М.[3], Клюйко Н.Л.[4], Богуш З.Ф.[1], Казинец О.Н.[1]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]23-й санитарно-эпидемиологический центр Вооруженных Сил Республики Беларусь;*

*[3]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии;*

*[4]Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье представлены результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга норовирусов в Беларуси в 2009–2013 гг. Показано значительное генетическое разнообразие норовирусов, циркулировавших в этот период. Идентифицированы глобальные эпидемические геноварианты *GII.4 2006b* и *GII.4 2009 New Orleans*, генотипы *GII.1*, *GII.6*, *GII.3*, рекомбинантные геноварианты *GII.g–GII.1* и *GII.g–GII.1*. На основании представленных данных сделан вывод о необходимости проведения регулярного молекулярно-эпидемиологического мониторинга для прогнозирования возможных сценариев развития эпидситуации по норовирусной инфекции и снижения уровня заболеваемости.

**Ключевые слова:** норовирус, молекулярная эпидемиология, генотип, глобальный эпидемический вариант, групповая и спорадическая заболеваемость.

**Введение.** Норовирусы (сем. *Caliciviridae*, род *Norovirus*) — вторые по распространенности после ротавирусов этиологические агенты острого гастроэнтерита у детей и доминирующие у взрослых. При этом норовирусы занимают лидирующее положение по частоте вызываемых ими вспышек ОКИ, особенно в закрытых и полузакрытых учреждениях, таких как школы-интернаты,

детские сады, лагеря, военные подразделения, круизные лайнеры, дома престарелых и т. д. Они являются доминирующими этиологическими агентами пищевых вспышек вирусных ОКИ. Все вышеизложенное определяет актуальность проблемы норовирусных инфекций и большое внимание, уделяемое этой проблеме учеными во всем мире.

В связи с отсутствием лабораторных моделей для культивирования норовирусов их изучение и лабораторная диагностика вызываемой ими инфекции базируются на молекулярных методах исследований. Эпидемиологический надзор за норовирусной инфекцией в значительной степени базируется на результатах молекулярно-эпидемиологического мониторинга. В настоящее время большинство развитых стран уже сформировало национальные системы эпидназора за норовирусами. Все они основаны на использовании молекулярно-генетических и биоинформационных методов исследований. Впервые такая система была создана в 1999 г. в рамках выполнения проекта "Food-borne viruses in Europe", когда лаборатории 13 стран объединились в единую сеть по надзору за кишечными вирусами, контаминирующими продукты питания — FBVEnet. В настоящее время после установления лидирующей роли норовирусов в возникновении групповой заболеваемости острыми гастроэнтеритами, в т. ч. с участием пищевого и водного фактора, FBVEnet была преобразована в международную сеть эпидемиологического надзора за норовирусами — NoroNet. Эта структура включает лаборатории США, Канады, Никарагуа, Венесуэлы, Чили, России, Нидерландов, Великобритании, Германии, Венгрии, Франции, Швеции, Израиля, Японии, Китая, Индии, Малайзии, Новой Зеландии и Австралии. Основным звеном NoroNet является системный молекулярно-эпидемиологический мониторинг — сбор и обмен информацией о генетических характеристиках циркулирующих вариантов НВ, их генотипах и субгенотипах [1].

В ходе изучения этиологической структуры вирусных ОКИ стала очевидна значительная роль норовирусов в формировании заболеваемости острыми гастроэнтеритами в Республике Беларусь. С 2009 г. в нашей стране осуществляется регулярный молекулярно-эпидемиологический мониторинг за этой группой кишечных вирусов. Настоящая работа посвящена анализу данных, полученных в ходе мониторинга, и их значимости для практического здравоохранения страны.

**Материалы и методы.** Материалом для проведения исследований были пробы фекалий, полученные от пациентов с клиническим диагнозом «вирусная ОКИ», «вирусный острый гастроэнтерит», «пищевая токсикоинфекция». Дифференциальную лабораторную диагностику норовирусной инфекции, вызванной вирусами II геногруппы, проводили у 691 пациента (584 ребенка, 107 взрослых), норовирусной инфекции, вызванной вирусами I геногруппы, — у 299 пациентов (все дети). Исследования проводили в периоды спорадической (2009–2012 гг.), а также групповой заболеваемости (12 эпизодов в 2009–2013 гг.).

Диагностику норовирусной инфекции проводили методом ОТ-ПЦР в пробах фекалий пациентов. Выделение ДНК/РНК из проб осуществляли с помощью коммерческих наборов «РИБО-преп» и «РИБО-сорб» (Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции использовали набор «Реверта» (Россия). Детекцию нуклеиновых кислот (НК) возбудителей проводили с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL», «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL», «АмплиСенс Norovirus 1,2 genotypes-EPh» в соответствии с инструкциями производителя.

Для секвенирования участков генома норовирусов использовали фрагмент 340 нт, локализованный в пределах 3'RdRp и амплифицируемый с помощью праймеров JV12/JV13 [2], а также фрагмент 280 нт, локализованный в гене VP1, который накапливали с помощью праймеров CapC/CapD1/CapD3 [3]. Секвенирование участков ДНК проводили методом терминации цепи в термоциклической реакции на ДНК-анализаторе CEQ8000 с использованием коммерческого набора DTCS Quick Start Kit (BECKMAN COULTER). Полученные нуклеотидные последовательности (прямую и обратную) для каждой исследуемой пробы выравнивали друг относительно друга для удаления неясных оснований и получения консенсусных последовательностей, которые использовали для дальнейшей работы. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [4]. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) осуществляли с помощью программы MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), версии 5.0 [5]. Определение оптимальной математической модели нуклеотидных замен проводили методом максимального правдоподобия с использованием скорректированного ин-

формационного критерия Акаике (AICc). Модель с минимальным значением AICc была выбрана в качестве оптимальной. Для филогенетической реконструкции использовали метод максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) [6] имплементированный в MEGA 5.2. Достоверность топологий филогенетических древ, оценивали методом псевдореплик (bootstrapping). Для оценки достоверности топологии по каждому древу проанализировали 1000 псевдореплик [7].

**Результаты и их обсуждение.** Генетическое разнообразие норовирусов чрезвычайно велико. Как известно, они обладают одноцепочечным геномом, представленным молекулой (+)РНК. Реализация генетической информации осуществляется с 3 открытых рамок считывания (ОРС), которые расположены в геноме последовательно с перекрытием в несколько нуклеотидов. ОРС1 кодирует неструктурные белки вируса, ОРС2 — основной капсидный белок VP1, ОРС3 — вспомогательный капсидный белок VP2. Уровень мутационной изменчивости норовирусов чрезвычайно высок и по последним данным составляет $1{,}21\times10^{-2}$ мутации/сайт/год в наиболее быстро изменяющемся гене VP1. Это самый высокий уровень мутаций даже среди быстро мутирующих РНК-содержащих вирусов. Кроме того, исследования последних 10 лет показали, что в формирование новых геновариантов норовирусов значительный вклад вносит генетическая рекомбинация. «Горячими точками» рекомбинации являются участки перекрытия ОРС. Рекомбинанты могут объединять в своем геноме участки двух или нескольких геномов, принадлежащих норовирусам различных генотипов или геновариантов.

Современная классификация норовирусов основана на их генетических характеристиках и эволюционных взаимоотношениях. На основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей основного капсидного белка норовирусов они были разделены на 5 геногрупп, обозначаемых римскими цифрами (I–V). Норовирусы человека входят в I, II и IV геногруппы. Помимо геногрупп выделяют также генотипы и эпидемические геноварианты норовирусов. В связи с постоянно увеличивающимся объемом информации о генетических особенностях норовирусов их классификация периодически подвергается пересмотру в соответствии с вновь открывающимися фактами [8].

В ходе исследований нами разработана «База данных о генотипах норовирусов, циркулирующих на территории Республики Беларусь», которая зарегистрирована в Государственном регистре информационных ресурсов (рег. свидетельство № 1761303599 от 02.09.2013 г.). В ней содержится информация о 157 норовирусах, обнаруженных в пробах клинического материала пациентов с ОКИ (ОГЭ). Она включает данные о 105 норовирусах, зарегистрированных в Беларуси в 2009–2012 гг. на фоне спорадической норовирусной заболеваемости. Помимо этого в базе данных содержится информация о 52 этиологических агентах, вызвавших 12 эпизодов групповой заболеваемости ОКИ. Генетические характеристики включают информацию о геногруппе вируса (10 норовирусов I геногруппы, в т. ч. 5 этиологических агентов вспышек и 5 — спорадических случаев, 147 норовирусов II геногруппы, из них 47 этиологических агентов вспышек и 100 — спорадических случаев). Кроме того, база данных содержит фрагменты нуклеотидных последовательностей гена РНК-полимеразы (35 норовируса) и гена основного капсидного белка VP1 (18 норовирусов). Для 9 норовирусов представлены результаты секвенирования по 2 регионам генома (РНК-полимераза и VP1). База данных содержит информацию о генотипе 41 норовируса, в т. ч. об 11 этиологических агентах вспышек и 30 норовирусов, вызвавших спорадические случаи заболевания. Она включает следующие генотипы: *GII.4* (26 норовирусов), *GII.3* (1 норовирус), *GII.6* (5 норовирусов), *G IIg/II.12* (5 норовирусов) *GII.1* (2 норовируса), *GIIg* (2 норовируса). В пределах генотипа *GII.4* идентифицировано 3 различных эпидемических варианта норовирусов. Кроме того, в базе имеется информация о рекомбинантных генотипах норовирусов: 5 норовирусов принадлежат рекомбинантному генотипу *GIIg/II.12* и 4 норовируса предположительно относятся к рекомбинантному генотипу *GIIg/II.1*.

Анализ представленных в базе данных генетических характеристик идентифицированных норовирусов позволяет дать описание их молекулярной эпидемиологии на территории РБ в 2009–2012 гг. Так, в 2009 г. заболеваемость норовирусной инфекцией имела спорадический характер и была связана с циркуляцией вирусов глобального эпидемического геноварианта *GII.4 2006b* (рисунки 1, 2).

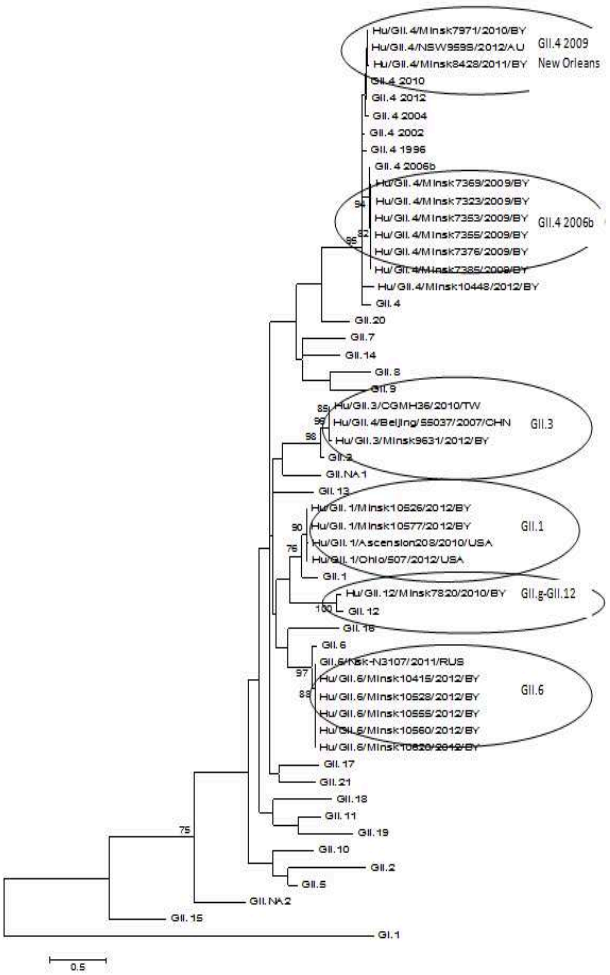



Рисунок 1 — Филогенетическая реконструкция по фрагменту гена VP1 (250 нт) 18 норовирусов, идентифицированных в 2009–2012 гг. в РБ

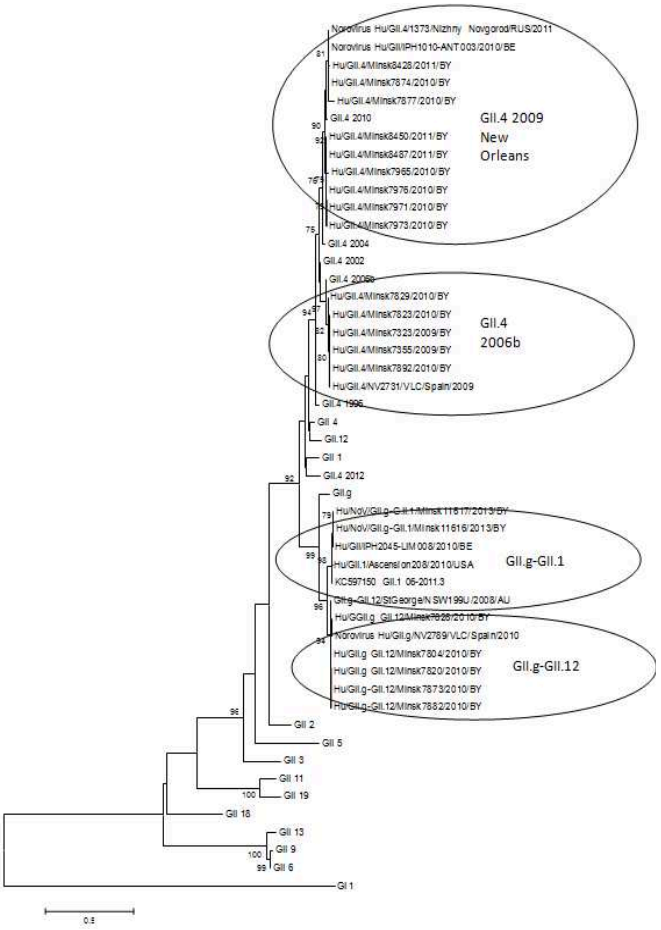



Рисунок 2 — Филогенетическая реконструкция по фрагменту гена РНК-полимеразы (350 нт) 21 норовируса, идентифицированного в 2009–2012 гг. в РБ

Данный геновариант впервые был идентифицирован, как видно из названия, в 2006 г. в Нидерландах (прототипный штамм Hu/DenHaag89/2006/NL), после чего он распространился по всему миру и вызвал значительные подъемы заболеваемости, а также многочисленные вспышки и эпидемии (Австралия, Европа, США) [9]. В нашей стране этот геновариант был преобладающим во время спорадической заболеваемости в 2009 г. и продолжил циркуляцию в 2010 г. База данных содержит информацию о генетических характеристиках 14 норовирусных изолятов, принадлежащих к этому эпидемическому геноварианту, в т. ч. 6 изолятов по 2-м регионам генома (фрагменты VP1 и РНК-полимеразы). По фрагменту гена РНК-полимеразы изоляты геноварианта *GII.4 2006b* демонстрируют 0–3,8% различий в нуклеотидной последовательности и 100% сходства в аминокислотной последовательности, по фрагменту VP1 — 1,6% различий в нуклеотидной последовательности, 100% сходства в аминокислотной последовательности. Вирусы, обладавшие 99-100% сходством нуклеотидной последовательности, в тот же период (2009–2010) циркулировали на территории множества различных стран — Испании, Бельгии, Франции, Словении, Люксембурга, России, Бразилии, США.

В 2010 г. регистрировалась как спорадическая, так и групповая заболеваемость норовирусной инфекцией. Два эпизода групповой заболеваемостив марте и мае 2010 г. были зарегистрированы в закрытых военных коллективах, возраст заболевших составил 18–86 лет, заболевание протекало в виде острого гастроэнтерита. Анализ генетических характеристик вирусов, вызвавших спорадическую заболеваемость, показал, что в 2010 г. продолжалась циркуляция глобального эпидемического геноварианта *GII.4 2006b* и появился новый, ранее нерегистрируемый, рекомбинантный генотип норовирусов *GII.g–GII.12*. В созданной базе данных содержися информация о генетических характе-

ристиках 5 изолятов этого генотипа. Филогенетическое группирование данных изолятов в составе различных кластеров при проведении анализа по 2-м различным регионам генома (VP1 и РНК-полимеразы) подтверждает их рекомбинантную природу (рисунки 1 и 2). В тот же период (2010 г.) указанный генотип появился и стал преобладающим на территории США: он вызвал 16% всех зарегистрированных норовирусных вспышек. Его распространение произошло также за пределы США, однако циркуляция была преимущественно связана со спорадической заболеваемостью (Австралия, Венгрия).

Групповая заболеваемость, зарегистрированная в Минске в 2010 г., была обусловлена появлением на территории страны нового глобального эпидемического геноварианта *GII.4 2009 New Orleans*. Эпидемический геновариант New Orleans впервые был зарегистрирован в Австралии в 2008 г. и получил глобальное распространение в 2009–2012 гг. Несмотря на глобальное распространение, данный геновариант не вызвал существенного подъема заболеваемости норовирусной инфекцией, как это имело место при появлении предшествующего геноварианта *GII.4 2006b*. Этиологические агенты вспышек, зарегистрированных в Беларуси в марте и мае 2010 г., группировались в составе общего кластера с соответствующим прототипным штаммом (рисунки 1, 2). Однако данные вспышки не были эпидемиологически связаны между собой. Так, возбудители норовирусных вспышек, произошедших в марте и в мае 2010 г., формировали на дендрограмме 2 обособленных монофилетических кластера в составе общего кластера, соответствующего геноварианту *GII.4 2019 New Orleans*. В состав этих кластеров входили также вирусы, идентифицированные у пациентов со спорадическими случаями ОКИ зимой 2011–2012 гг., что указывает на его дальнейшее распространение в популяции. Данный геновариант является ОРС 1/2 рекомбинантом, получившим одну часть генома (ОРС 1) от ранее циркулировавшего геноварианта *GII.4 2006a*, а другую часть (ОРС 2, 3) — от геноварианта *GII.4 2008 Appledorn* [10].

Норовирусы, вызвавшие спорадическую заболеваемость зимой 2011 г., принадлежали к геноварианту *GII.4 2009 New Orleans* и рекомбинантному генотипу *GII.g–GII.12*, описанным выше. Оба этих геноварианта были новыми для населения Беларуси, что определило значительный рост доли пациентов с норовирусной инфекцией в 2011 г. по сравнению с 2009–2010 гг.

В 2012 г. в Минском регионе имело место значительное генетическое разнообразие циркулировавших генотипов и геновариантов норовирусов. Так, у пациентов со спорадическими случаями инфекции были идентифицированы вирусы генотипов *GII.1* и *GII.6*, а также вирусы глобального геноварианта *GII.4 2009 New Orleans*. Кроме того, в 2012 г. были зарегистрированы 2 эпизода групповой заболеваемости норовирусной инфекцией у детей, вызванных генотипами *GII.3* и *GII.6*. Таким образом, всего в 2012 г. было зарегистрировано 4 различных генотипа норовирусов. Всего в базе данных содержится информация о генетических характеристиках 9 идентифицированных в 2012 г. норовирусов, в т. ч. генотипа *GII.3* (1 изолят), *GII.1* (2 изолята), *GII.4 2009 New Orleans* (1 изолят), *GII.6* (5 изолятов).

Групповая заболеваемость норовирусной инфекции в январе 2012 г. была вызвана вирусом, относящимся по гену VP1 к генотипу *GII.3*. Данный генотип ни до, ни после обострения эпидситуации не встречался на территории нашей страны. Норовирусы, обладавшие высокой степенью сходства (98%) с «белорусским вспышечным вирусом», циркулировали в 2007–2010 гг. на территории азиатских стран (Китай, Тайвань). Можно предположить, что групповая заболеваемость 2012 г. в Беларуси была связана с заносом этого вируса на территорию страны. Однако дальнейшего его распространения, как это имело место в случае с эпидемическим вариантом *GII.4 2009 New Orleans* в 2011 г., не произошло.

Генотип *GII.6* широко циркулировал в 2012 г. и вызвал как спорадическую, так и групповую заболеваемость в июле 2012 г. Все идентифицированные изоляты имели 99–100% сходства нуклеотидной последовательности между собой, а также с вирусами, циркулировавшими в предшествующие годы в России и Европе (Бельгия), что указывало на широкое распространение данного генотипа.

Генотип *GII.1*, вызвавший спорадические случаи заболеваемости в 2012 г., с высокой долей вероятности обладал рекомбинантным геномом, в котором ген РНК-полимеразы принадлежал генотипу *GII.g*. Это предположение было сделано на основании высокой (98–99%) степени сходства нуклеотидной последовательности гена VP1 норовирусов, идентифицированных в Беларуси, и вирусов, циркулировавших в 2010–2012 гг в США, рекомбинантная природа которых была доказана полногеномным секвенированием. Более того, вирусы, обладающие рекомбинантным *GII.g–GII.1*

геномом, вызвали групповую заболеваемость в Беларуси в следующем, 2013 г. Следует отметить, что вирусы, *GII.1*, идентифицированные в 2012 г., пока секвенированы по гену РНК-полимеразы, поэтому для окончательного подтверждения их рекомбинантной природы необходимо проведение дальнейших исследований.

**Выводы.** В ходе молекулярно-эпидемиологических исследований получена ценная обширная информация, представляющая несомненный интерес исследователей и практических специалистов, осуществляющих эпидемиологический надзор за острыми кишечными инфекциями. Установлено, что большинство эпизодов групповой заболеваемости норовирусной инфекцией, а также ее выраженные сезонные подъемы в 2010–2011 гг. были связаны с появлением глобального эпидемического варианта *GII.4 2009 New Orleans*. Кроме того, абсолютное большинство (4 из 5 случаев) зарегистрированных вспышек были вызваны геновариантами (генотипами), ранее вызвавшими вспышки в других странах мира. Исходя из вышеизложенного очевидно, что своевременное проведение молекулярно-эпидемиологических исследований и выявление геновариантов норовирусов с высоким эпидемическим потенциалом, является хорошей и аргументированной научной базой для адекватного прогнозирования эпидситуации по норовирусной инфекции и в случае необходимости осуществления адекватных мероприятий, направленных на профилактику и снижение уровня заболеваемости.

**Литература**


1. NoroNet [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet. — Загл. с экрана.
2. International Collaborative Study To Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses / J. Vinje [et al.] // J. Clin. Micr. — 2003. — Vol. 41, № 4. — P. 1423–1433.
3. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses / S. Kojima [et al.] // J. Virol. Meth. — 2002. — Vol. 100. — P. 107–114.
4. Basic local alignment search tool / S. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 215. — P. 403–410.
5. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2011. — Vol. 28, № 10. — P. 2731–2739.
6. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach / J. Felsenstein // J. Mol. Evol. — 1981. — Vol. 17, № 6. — P. 368–376.
7. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. — 1985. — Vol. 39. — P. 783–791.
8. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping / A. Kroneman [et al.] // Arch. Virol. — 2013. — [Epub ahead of print].
9. Evolutionary dynamics of *GII.4* noroviruses over a 34-year period / K. Bok [et al.] // J. Virol. — 2009. — Vol. 83, № 22. — P. 11890–11901.
10. Recombination within the pandemic norovirus *GII.4* lineage / J. Eden [et al.] // J. Virol. — 2013. — Vol. 87, № 11. — P. 6270–6282.


## MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF NOROVIRUSES IN THE REPUBLIC OF BELARUS: PRINCIPAL RESULTS AND THEIR PRACTICAL IMPORTANCE


**Paklonskaya N.V.[1], Amvrosieva T.V.[1], Dziadzula K.L.[1], Hodin D.V.[2], Dashkevich A.M.[3], Kluiko N.L.[4], Bogush Z.F.[1], Kazinetz O.N.[1]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]23th Sanitary-Epidemiological Center of the Armed Forces of the Republic of Belarus;*

*[3]Minsk City Centre of Hygiene and Epidemiology;*

*[4]City Children's Clinical Hospital of Infectious Diseases? Minsk? Belarus*



The study presents the results of molecular surveillance for norovirus in Belarus in 2009–2013. Substantial genetic diversity of circulating norovirus was represented by global epidemic genovariants *GII.4 2006b* and *GII.4 2009 New Orleans*, genotypes *GII.1*, *GII.6*, *GII.3*, recombinant genovariants *GII.g–GII.1* and *GII.g–GII.2*. On the basis of the data, it was concluded about importance of regular molecular epidemiological investigation to predict probable epidemic scenario and to reduce norovirus morbidity.



**Keywords:** norovirus, molecular epidemiology, genotype, global epidemic variant, group and sporadic morbidity.

Поступила 06.09.2013

# АРБОВИРУСЫ И АРБОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

**Самойлова Т.И.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье приведен краткий обзор мероприятий, направленных на выявление и изучение арбовирусов и вызываемых ими инфекций в Республике Беларусь.

**Ключевые слова:** арбовирусы, арбовирусные инфекции, Республика Беларусь.

Арбовирусы и вызываемые ими инфекции интенсивно изучаются во многих странах мира, в том числе и на территории Республики Беларусь [1–10]. Это связано с тем, что многие арбовирусы способны вызывать тяжелые заболевания у людей и животных, иногда с эпидемическим распространением [4, 6, 7, 11]. Постоянно увеличивается число новых, ранее неизвестных арбовирусов, патогенных для человека и животных [12, 13]. Не снижается заболеваемость клещевым энцефалитом во многих странах Европы, включая страны СНГ [14–18].

Арбовирусные инфекции — это инфекции с природной очаговостью, которые в естественных условиях передаются, главным образом, через укус инфицированного клеща или насекомого, хотя возможны и другие пути передачи. Большинство из этих инфекций являются зоонозами. Циркуляция возбудителя осуществляется среди диких, домашних животных, птиц и кровососущих членистоногих — возможных переносчиков и резервуаров арбовирусных инфекций.

Природные условия Беларуси способствуют жизни и размножению кровососущих членистоногих, являющихся переносчиками и резервуарами ряда возбудителей изучаемых инфекций. Заболоченность значительных площадей, обилие мелких, хорошо прогреваемых водоемов создают, особенно в южной ландшафтно-климатической зоне Беларуси, благоприятные условия для выплода большого количества кровососущих комаров. Это обстоятельство особенно важно, если учесть, что эта зона лежит на северной границе ареала распространения арбовирусов с комариной трансмиссией. Кроме того, фауна арбовирусов республики формировалась под влиянием многократного наступления и отступления ледников, в результате чего происходили сукцессии очагов, их перемещения, менялись хозяева и переносчики и, как следствие, образовывались новые генетические формы арбовирусов. Так же важным фактором является занос арбовирусов мигрирующими птицами из других регионов во время весенних и, вероятно, осенних перелетов [19, 20].

В Беларуси арбовирусы и арбовирусные инфекции начали изучаться с начала 40-х гг., когда на территории Беловежской пущи были выявлены природные очаги клещевого энцефалита (КЭ) и выделен вирус из клещей *Ixodes ricinus* [21, 22]. У истоков изучения КЭ в Беларуси стояли выдающиеся ученые — академики М.П. Чумаков, Л.А. Зильбер, В.И. Вотяков и др. Неоценимый вклад в изучение проблемы КЭ внесли исследования, проведенные под руководством академика В.И. Вотякова, доказавших нозологическую самостоятельность ЗКЭ [23, 24]. Однако, до 1970-х гг. другие арбовирусные инфекции в РБ не были известны. Следует отметить, что работы по разведке арбовирусов, не относящихся к группе КЭ, начались после того, как был сделан прогноз возможности существования природных очагов арбовирусных инфекций как с клещевой, так и комариной трансмиссиями в Беларуси. В результате проведенных нами вирусологических и серологических исследований на территории РБ была выявлена циркуляция 13 арбовирусов: клещевого энцефалита (КЭ), Западного Нила (ЗН), Укуниеми, Трибеч, Батаи, Семлики, Синдбис, Тягиня, Инко, Зайца беляка, Киндиа, Блютанг, Моссурил, относящихся к 5-ти семействам: *Flavi-*, *Toga-*, *Bunya-*, *Reo-* и *Rhabdoviridae* [10] — таблица.

Более половины циркулирующих в РБ арбовирусов способны вызывать заболевания у людей. Наиболее опасными в эпидемиологическом отношении являются возбудители КЭ, Западно-Нильского энцефалита (ЗНЭ) и серогруппы калифорнийского энцефалита (СКЭ) — Инко, Зайца беляка и Тягиня. Официальной статистикой в республике регистрируется только КЭ, другие же арбовирусные инфекции, как малоизученные, практическим здравоохранением не учитываются. В связи с тем, что вновь выявляемые арбовирусные инфекции часто проходят под другими диагнозами, либо не диагностируются вообще, встает задача проводить их эпидемиологический мониторинг в РБ.

Таблица — Вирусологические и серологические доказательства циркуляции арбовирусов на территории Беларуси

| Семейство | Вирусы | Патогенность для человека | Доказательства | |
|---|---|---|---|---|
| | | | вирусологические | серологические |
| *Flaviviridae* | Клещевой энцефалит | У | + | + |
| | Западный Нил | У | + | + |
| *Togaviridae* | Синдбис | У | – | + |
| | Семлики | У | + | + |
| *Bunyaviridae* | Укуниеми | У | + | + |
| | Батаи | У | + | + |
| | Инко*) | У | – | + |
| | Зайца-беляка *) | У | – | + |
| | Тягиня | У | – | + |
| *Reoviridae* | Трибеч | НИ | + | + |
| | Киндиа | НИ | – | + |
| | Блютанг **) | НИ | – | + |
| *Rhabdoviridae* | Моссурил | НИ | – | + |

Примечания. У — установлена патогенность для человека; НИ — патогенность для человека не изучена; *) — обнаружен антиген вируса; **) — вирус вызывает тяжелое заболевание у овец.

Для краевой патологии республики наиболее значимая арбовирусная инфекция — клещевой энцефалит, основным переносчиком возбудителя которого является лесной клещ *I. ricinus*. В циркуляции вируса КЭ может принимать участие и луговой вид клеща — *D. pictus*. От зараженных клещей вирус может передаваться диким, домашним животным, птицам и человеку. Заражение может произойти как при присасывании клеща к коже человека, так и при употреблении козьего или коровьего молока, если животные — носители вируса. Кипячение молока полностью убивает вирус КЭ. Инфицирование происходит также контактным путем (через мелкие повреждения кожи при раздавливании клеща). Развитие инфекционного процесса при КЭ происходит в несколько стадий: от начальной до периода локализации и размножения вируса в ЦНС. В настоящее время уже доказано существование 3 основных генотипов вируса КЭ, которые дифференцируются по тяжести клинического течения: дальневосточный, западный и урало-сибирский КЭ [9, 25].

На территории Беларуси циркулируют в основном штаммы западного КЭ, хотя отмечен и восточный КЭ. Совместно с сотрудниками Иркутского НИИ эпидемиологии и микробиологии РФ, проведено генотипирование 10 штаммов вируса КЭ, изолированных в РБ. Установлено, что 1 штамм вируса КЭ (118-КЭ), выделенный от птиц в Мядельском районе на границе с Литвой, оказался штаммом вируса восточного КЭ [25]. Возможно это случайный занос вируса КЭ птицами с сопредельных стран, где циркулируют различные генотипы вирусов. Это покажут наши дальнейшие исследования. Остальные изученные штаммы оказались вирусом западного генотипа КЭ. На основании молекулярно-эпидемиологических исследований установлена доминирующая циркуляция вируса западного генотипа КЭ, что указывает на целесообразность разработки вакцины из «местных» штаммов вируса.

Западный КЭ отличается более доброкачественным клиническим течением с низкой летальностью. Заболевание может протекать как остро, так и хронически. Течение КЭ характеризуется периодичностью или фазностью. На начальных стадиях болезни симптомы очень схожи с заболеваниями ОРВИ, ОРЗ, бронхитом. Инкубационный период (время от момента заражения до появления первых признаков заболевания) колеблется от 7 до 16 дней. При алиментарном заражении (через молоко) скрытый период обычно короче и длится 3–4 дня. Заболевание начинается остро с головных болей в лобной области и в суставах, тошноты. Температура в первые 3–5 дней не превышает 37–38°С. На 4–5-е сут. в большинстве случаев заболевание угасает. Однако на 10–16-е сут. может развиться его вторая волна, сопровождающаяся сильными головными болями, высокой температурой

(39–40°С), рвотой. В организме людей, переболевших КЭ, образуются противовирусные антитела, которые сохраняются в крови и защищают от новых заражений. КЭ необходимо дифференцировать от других инфекций, особенно, таких как болезнь Лайма, широко распространенная на территории нашей республики и имеющая одного и того же переносчика с вирусом КЭ. Серологический диагноз КЭ основывается на приросте (4-кратном и выше) титра специфических антител, определяемых в РТГА, РСК, ИФА, МФА, что дает возможность подтвердить клинический диагноз.

Вирус КЭ циркулирует на территории всей республики, однако наиболее напряженные природные очаги, где ежегодно выявляются больные КЭ и высокая вирусофорность переносчика зарегистрированы на территориях областей: Брестской — Гродненской (Каменецко-Пружанский очаг с примыканием к нему на севере Свислочского, а с юга — Малоритского), Минской — Могилевской (Пуховичско-Осиповичский с примыканием с севера Стародорожско-Любанского очага) и Гомельской (Светлогорско-Речицкий очаг).

Уровень заболеваемость КЭ в республике носит волнообразный характер с периодическими спадами и подъемами. Если в 1972–1981 гг. она равнялась 0,37 на 100 тыс. населения, в следующем десятилетии наметилась лишь тенденция ее подъема до 0,66 на 100 тыс. населения, а, начиная с 1993 г. произошел резкий подъем заболеваемости, и за пять лет показатель составил 2,55 на 100 тыс. населения. В 2000 г. показатель заболеваемости был равен 0,23 на 100 тыс. населения, в 2001 г. был выявлен 61 больной КЭ, в 2002 г. — 18, а в 2003 г. отмечался подъем заболеваемости до 53 случаев КЭ. В 2012 г зарегистрировано 118 случаев заболевания КЭ, включая 15 случаев алиментарного КЭ из Лидского района Гродненской области и 2 летальных случая в г. Минске и г. Гродно. В последние годы отмечается как алиментарный, так и трансмиссивный пути инфицирования с преобладанием последнего (80,9%). В 90-е гг. повысилась активность природных очагов, имеющая свои закономерности и, по-видимому, связана с неоднородностью природной популяции вируса. Вирусологические исследования полевых материалов от клещей, комаров, мелких диких млекопитающих и птиц, а также материала от больных людей с подозрением на КЭ позволили выделить и идентифицировать 208 штаммов вируса КЭ, среди которых наиболее высокий процент от выделенных штаммов составляли изоляты из клещей *I. ricinus* и мелких диких млекопитающих (31,25 и 28,85 соответственно). Вирус КЭ может находиться также в клещах *D. pictus*. Популяция вируса КЭ располагается также в комарах и птицах. Ежегодно выделяются штаммы вируса КЭ из различных источников. Только в 2011–2012 гг. выделено 8 изолятов вируса КЭ.

Для своевременного выявления больных и подтверждения клинического диагноза КЭ необходимы высокочувствительные диагностические препараты, приготовленные из местных штаммов вируса. С этой целью нами были разработаны и зарегистрированы тест-система для определения антител класса М и G к вирусу клещевого энцефалита непрямым методом флуоресцирующих антител (ТУ BY100558032.124-2007, рег. удостоверение № ИМ-7.93506/0912 от 30.11.2007), тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М и G к вирусу клещевого энцефалита (ТУ BY 100558032.158-2011, рег. удостоверение № ИМ-7.97816 от 28.06.2011), тест-система для выявления антигена вируса клещевого энцефалита в переносчиках и клиническом материале методом иммуноферментного анализа (ТУ BY 100558032.198-2012, рег. удостоверение № ИМ-7.00297 от 31.08.2012). В ближайшее время планируется разработка ПЦР тест-системы для экспресс-диагностики КЭ.

Среди других арбовирусных инфекций, наиболее значимых в эпидемиологическом отношении для РБ, является вирусный Западно-Нильский энцефалит (ВЗНЭ), возбудитель которого — вирус Западного Нила (ЗН). Вирус ЗН охватывает практически весь африканский континент, Юго-Западную и Южную Азию, Южную Европу, включая и некоторые ее центральные части, где отмечается заболеваемость с эпидемическими вспышками. В последние годы вирус ЗН становится все более агрессивным и вызывает заболевания даже в тех регионах, в которых он не был ранее известен. Так, эпидемическая вспышка, вызванная вирусом ЗН, произошла в 1999–2001 гг. в Северной Америке, впервые на американском континенте [2]. Заболевание возникло в конце июля–сентябре с пиком во второй половине августа в Нью-Йорке и его окрестностях. Было зарегистрировано 56 случаев, из которых 7 были с летальным исходом. Вирус ЗН был выявлен с помощью ПЦР в комарах рода *Culex*, а также в мозге погибших птиц. Несколько раньше обширная эпидемическая вспышка этого заболевания возникла в юго-восточной Румынии, включая Бухарест. Было госпитализировано 835 больных с явлениями поражения ЦНС. Лабораторно подтверждено 393 случая, 7 больных умерли. При этом

отмечено, что тяжесть течения и летальность возрастают с возрастом больных. Вирус был изолирован из спинномозговой жидкости, а так же из комаров *Culex pipiens* с помощью ПЦР [7]. Эпидемические вспышки, вызванные вирусом ЗН, произошли и в соседней России. В июле–сентябре 1999 г. в Российской Федерации отмечалось резкое ухудшение эпидемиологической ситуации по заболеваемости вирусными лихорадками, осложненными менингитами и менингоэнцефалитами. Вспышки заболевания, вызванные вирусом ЗН, сопровождались тяжелым клиническим течением и даже оканчивались летально. При лабораторном обследовании у 190 заболевших в Волгоградской, 89 — в Астраханской областях и 31 — в Краснодарском крае выявлены антитела к вирусу ЗН, т. е. подтвержден диагноз Западно-Нильской инфекции. За период с 1999 по 2012 гг. в РФ зарегистрировано более 1600 случаев Западно-Нильской инфекции. В 2013 г. уже имеются новые случаи заболевания с летальными исходами.

Необходимо отметить, что вспышки в Румынии, США и России, вызванные вирусом ЗН, характеризовались высокой долей менингитов и мениигоэнцефалитов (более 50%), высокой летальностью (около 10%). Резкое утяжеление и изменение клинической картины болезни, судя по летальности и характеру патоморфологических данных, указывают на вероятность появления новых модификаций вируса ЗН, обладающего повышенной вирулентностью [26]. Неблагоприятная эпидситуация по ЗНЭ в мире сохраняется и в настоящее время.

С целью выявления циркуляции вируса ЗН на территории Беларуси нами были проведены вирусологические и серологические исследования кровососущих комаров, мошек, иксодовых клещей, мелких диких млекопитающих и птиц, а также образцов крови и спинномозговой жидкости от больных людей с различными недифференцированными лихорадками и здорового населения. В результате наших исследований впервые в республике выделено 4 изолята вируса ЗН: 1 от птиц (48-ЗН Тремля), 2 от комаров рода *Aedes* (319 и 2438) и 1 — из крови лихорадящего больного (Вин.). Изучены их антигенные и биологические свойства на лабораторных животных и культурах клеток. Выявлена идентичность полученных изолятов между собой и установлена их близкородственная связь с эталонным штаммом вируса Eg-101, являющимся топотипным для африканской группы вирусов. Тем самым показано, что на территории Республики Беларусь циркулирует популяция вируса ЗН, близкородственная африканскому варианту [27]. Обширными иммунносерологическими исследованиями 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 вируса ЗН выявлено в комарах родов *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, мошках рода *Boophthora* и клещах *I. ricinus*. Однако основную роль в циркуляции вируса ЗН, по нашему мнению, в природных очагах на территории Беларуси играют кровососущие комары и птицы, от которых выделены штаммы вируса ЗН. Кроме того, в комарах, синантропных видов рода *Culex*, собранных на территории Гомельской области, и рода *Anopheles* (Минская область), выявляется антиген вируса ЗН (22,2 и 18,2% соответственно). Выявлены 20 серологически подтвержденных (4-кратное нарастание титров специфических антител к вирусу в парных сыворотках) случаев вирусного ЗНЭ среди лихорадящих больных неясной этиологии в эпидемический сезон. В процессе исследований по обнаружению антител к вирусу ЗН у людей мы наблюдали случаи, при которых антитела с 4-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°С. Все это сопровождалось сильной головной и мышечной болями, ознобом, отмечалось увеличение шейных и затылочных лимфатических узлов, у 20–50% больных регистрируется сыпь, у части больных наблюдаются боль в горле, диарея, потеря аппетита и рвота. Инкубационный период составлял 2–6 дней. У части больных имели место серозные 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 вируса ЗН.

В клинической картине Западно-Нильской инфекции, описанной Ю.Я. Венгеровым и соавт. (2000), отмечалось острое начало болезни, озноб, высокая лихорадка (до 39°С и выше), миалгия и головная боль. Лихорадочный период длился от 3 до 14 дней, причем у отдельных больных лихо-

радка была двухволновой. При осмотре у больных полиморфная пятнисто-папулезная сыпь. У некоторых больных наблюдалось тяжелое течение болезни с развитием картины менингоэнцефалита [26]. В связи с интенсивной циркуляцией вируса в республике, нами постоянно проводится мониторинг природных очагов, готовится тест-система для выявления антигена вируса Западного Нила в переносчиках и клиническом материале методом иммуноферментного анализа. В настоящее время приготовлены и зарегистрированы тест-система для определения антител класса M и G к вирусу Западного Нила непрямым методом флуоресцирующих антител (ТУ BY 100558032.125-2007, рег. удостоверение № ИМ-7.93512/0912 от 30.11.2007), тест-система иммуноферментная для выявления антител класса M и G к вирусу Западного Нила (ТУ BY 100558032.159-2011, рег. удостоверение № ИМ-7.97815 от 28.06.2011).

Кроме того, в республике могут встречаться заболевания, вызываемые вирусами Синдбис, серогруппы Калифорнийского энцефалита, Батаи и др. [28].

Вирус Синдбис — типичный представитель семейства *Togaviridae* рода *Alphavirus*. Природным резервуаром вируса являются птицы, которые во время сезонных миграций могут осуществлять трансконтинентальный перенос. Вирус циркулирует во многих странах Африки, Америки, и Европы. Его циркуляция выявлена нами на территории Брестской, Гомельской, Минской и Витебской областях. Антитела к вирусу Синдбис обнаружены в сыворотках крови птиц, КРС и людей. Кроме того, при обследовании остролихорадящих больных у 8 из них обнаруживались антитела в титрах от 1:10 до 1:40 (Брестская и Витебская области). У всех выявленных больных клиническая картина заболевания соответствовала лихорадке, вызываемой вирусом Синдбис. По данным Д.К. Львова и соавт. (1991), клиническая картина заболевания характеризуется острым началом с высокой температурой, головной болью. В первые дни заболевания появляется папулезно-везикулярная сыпь, содержимое пузырьков может быть источником изоляции возбудителя. Больные отмечают сильные мышечные боли, боли в суставах. Продолжительность заболевания около 2 недель [29].

В настоящее время известно не менее 15 вирусов СКЭ (род *Bunyavirus* сем. *Bunyaviridae*). Они распространены в Африке, Азии, Америке и Европе и передаются кровососущими комарами. По имеющимся данным вирусы Инко, Тягиня и Зайца-беляка патогенны для человека. На территории Беларуси антигены вирусов Инко и Зайца-беляка обнаружены в кровососущих комарах родов *Culex*, *Anopheles* и *Aedes*, а вируса Тягиня в комарах родов *Aedes* и *Culex*. При исследовании сывороток крови от лихорадящих больных с различными диагнозами: ОРВИ, ОРЗ, пневмония, острые бронхиты в весенне-летний период нами были обнаружены антитела к вирусу Тягиня в титрах от 1:20 до 1:40. Для заболеваний, вызванных вирусами СКЭ, характерна сезонность, совпадающая с периодом максимальной активности переносчиков. Заболевание характеризуется острым началом, ознобом, высокой температурой в первые часы заболевания, быстрым нарастанием симптомов. В клинической картине ведущим является гипертензионный синдром: головная боль и рвота. Во всех случаях постановка заключительного диагноза осуществляется на основании вирусологических и серологических результатов обследования больного [29].

Вирус Батаи из сем. *Bunyaviridae*, возбудитель лихорадки Батаи, широко распространен в странах СНГ, связан с комарами рода *Anopheles* и встречается повсеместно в южных и центральных районах Европейской части. В Беларуси вирус Батаи был впервые выделен из комаров рода *Aedes* на территории Брагинского, а из комаров рода *Anopheles* на территории Речицкого районов Гомельской области. Было показано, что циркуляция вируса Батаи происходит и на территории других областей (Брестской, Могилевской и Витебской), где у птиц, КРС и людей обнаружены антитела. При исследовании сывороток крови от больных с различными диагнозами (ОРВИ, ОРЗ, пневмония неясной этиологии, острый бронхит) у 11 человек из Гомельской, Брестской, Витебской и Минской областей выявлены антитела к вирусу Батаи в титрах 1:10 – 1:40 [30].

Кроме перечисленных арбовирусов и вызываемых ими заболеваний при исследовании сывороток крови от лихорадящих больных нами были обнаружены антитела к вирусам: Семлики, Трибеч, Киндиа, Моссурил и Укуниеми. Циркуляция арбовирусов на территории РБ приведена на карте-схеме (рисунок).

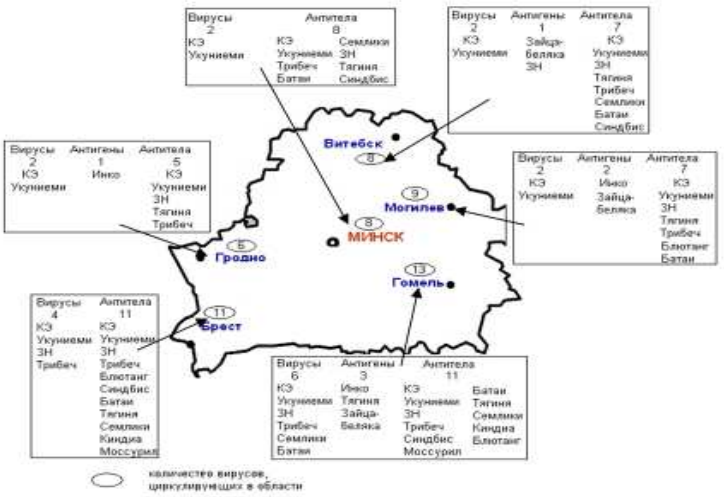



Рисунок — Карта-схема циркуляции арбовирусов в Республике Беларусь

Как видно из рисунка, циркуляция арбовирусов происходит на территории всех областей республики, а наиболее интенсивная циркуляция отмечена в Гомельской и Брестской областях, где установлена циркуляция 13 и 11 арбовирусов соответственно. Таким образом, благодаря проведенным комплексным исследованиям на территории Республики Беларусь выявлена циркуляция 13 арбовирусов из 5 семейств, 12 из которых являются ранее неизвестными для РБ.

**Выводы.** Основные достижения при изучении арбовирусов и вызываемых ими инфекций в РБ можно сформулировать следующим образом:

- на территории Республики Беларусь выявлена циркуляция 13 арбовирусов из 5 семейств, 12 из которых (Укуниеми, Трибеч, ЗН, Батаи, Семлики, Синдбис, Тягиня, Инко, Зайца-беляка, Киндиа, Блютанг и Моссурил), ранее неизвестных для РБ, изучены их биологические свойства и экологические особенности, а также их роль в патологии человека, что явилось вкладом в развитие учения о природной очаговости трансмиссивных вирусных инфекций;

- разработана и научно обоснована гипотеза: на территории Республики Беларусь, которая входит в ландшафтно-климатическую зону, расположенную между 48° и 56° северной широты, происходит закономерная циркуляция арбовирусов как с клещевой, так и с комариной трансмиссией, широко распространенных не только на сопредельных с РБ территориях, но и в других странах;

- получены новые данные при изучении КЭ в Беларуси: научное обоснование трех периодов изменения напряженности природных очагов КЭ и заболеваемости в Республике Беларусь, установление структуры расположения природной популяции вируса КЭ в различных биологических системах, а также дано представление о природном очаге КЭ в современных условиях; проведено генотипирование штаммов вируса КЭ и ЗН, изолированных в Беларуси;

- составлена карта-схема арбовирусов в Беларуси с указанием районов их циркуляции, это даёт возможность органам здравоохранения в плановом порядке проводить своевременные противоэпидемические и профилактические мероприятия по борьбе с арбовирусными инфекциями.

В заключение следует отметить, что общими особенностями арбовирусных инфекций являются:

- сезонность передачи инфекции, связанная с началом активности кровососущих членистоногих — комаров и клещей;

- приуроченность заражения к сельской местности;

- ведущее клиническое заболевание – лихорадка.

На первый план должна быть поставлена диагностическая работа — серологическое и вирусологическое обследование больных и подозрительных лиц на заболевания арбовирусной этиологии, а также профилактика заражения населения этими инфекциями. Практические органы здравоохранения должны уделять больше внимания этиологической расшифровке сезонных лихорадок неясной этиологии, что позволит более целенаправленно проводить противоэпидемические мероприятия на местах. С целью предотвращения заражения людей КЭ и другими арбовирусными инфекциями предусмо-

трены меры неспецифической и специфической профилактики, которые направлены на оздоровление природных комплексов, расположенных вокруг населенных пунктов, санаториев, баз отдыха, детских летних оздоровительных лагерей, садово-огороднических кооперативов и др.

К мерам неспецифической профилактики относятся:

- индивидуальная защита от нападения клещей при посещении лесных массивов;
- санитарно-просветительная работа среди населения по профилактике КЭ и возможных осложнений заболевания (следует своевременно обращаться за медицинской помощью при появлении лихорадочного состояния в сочетании с суставными, мышечными или головными болями);
- мониторинг численности кровососущих членистоногих и их прокормителей и организация профилактических и по эпидпоказаниям дезинсекционных и дератизационных мероприятий на местах.

Специфическая профилактика на территории Республики Беларусь предусмотрена только для КЭ и заключается в проведении вакцинации. Она необходима только в тех районах, где постоянно регистрируются случаи болезни. Также обязательна прививка тем жителям, кто выезжает за пределы республики в эпидемиологически неблагоприятные районы стран СНГ, и лицам, направляющимся на сезонные работы в государственные заповедники.

Для успешного решения проблемы арбовирусных инфекций в первую очередь необходимо:

- совершенствование системы эпидемиологического мониторинга с широким внедрением в практику здравоохранения наиболее чувствительных современных методов лабораторной диагностики, в т. ч. молекулярно-биологических;
- оснащение лаборатории арбовирусных инфекций современным медицинским и лабораторным оборудованием;
- подготовка высококвалифицированных специалистов области арбовирусологии.

Для недопущения вспышечной заболеваемости Западно-Нильским вирусным энцефалитом в Беларуси чрезвычайно важным и актуальным является эпидемиологическая настороженность практических врачей с целью более широкого лабораторного обследования пациентов с отягощенным эпиданамнезом на выявление заболевания.

**Литература**


1. Identification of Kunji in West-Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis (Letter) / T. Briese [et al.] // Lancet. — 1999. — Vol. 354. — P. 1261–1262.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemic/ Epizootic West Nile Virus in the United States: Revised Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. — Colorado, 2001. — 104 p.
3. Chiles, R.E. A new enzyme immunoassay to detect antibodies to arboviruses in the blood of wild birds / R.E. Chiles, W.K. Reisen // J. Vector. Ecol. — 1998. — Vol. 23, № 2. — P. 123–135.
4. Prevalence of antibodies to West Nile fever, sandfly fever Sicilian, and sanfly fever Naples viruses in healthy adults in Israel / D. Cohen [et al.] // Public. Health. Rev. 1999. — Vol. 27, № 1–3. — P. 217–230.
5. Antibodies to alphavirus, flavivirus and bunyavirus arboviruses in house sparrows (Passer domesticus) and tree sparrows (P. montanus) in Poland / Z. Juricova Z. [et al.] // Avian. Dis. — 1998. — Vol. 42, № 1. — P. 182–185.
6. Hubalek, Z. West Nile fever — a reemerging mosquitoborne virus disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 5. — P. 648.
7. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania / T.P. Tsai [et al.] // Lancet. — 1998. — Vol. 352. — P. 767–771.
8. Turcovic, B. Arboviruses in Croatia / B. Turcovic, Z. Brudnjak // Acta Med. Croatica. — 1998. — Vol. 52, № 2. — P. 87–89.
9. Вотяков, В.И. Клещевые энцефалиты Евразии (вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозрлогии, эволюции) / В.И. Вотяков, В.И. Злобин, Н.П. Мишаева. — Новосибирск: Наука, 2002. — 438 с.
10. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в Республике Беларусь: (полевые и экспериментальные исследования): дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06; 14.00.30 / ГУ НИИЭМ; МЗ РБ РБ. — Минск, 2003.
11. Эпидемические вспышки менингита и менингоэнцефалита в Краснодарском крае и Волгоградской области, вызванные вирусом Западного Нила / Д.К. Львов и др. // Вопр. вирусологии, — 2000. — № 1. — С. 37–38.
12. al-Afaleq, Al Prevalence of neutralizing antibodies to Akabane virus in ruminants in Saudi Arabia / Al al-Afaleq, E.M. Elzein, P.S. Mellor // Zentralbl. Veterinarmed. — 1998. — Vol. 45, № 5. — P. 257–262.
13. Yoshida, K. Rapid detection of antigenic diversity of Akabane virus isolates by dot immunobinding assay using neutralizing monoclonal antibodies / K. Yoshida, T. Tsuda // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1998. — Vol. 5, № 2. — P. 192–198.
14. Аммосов, А.Д. Клещевой энцефалит / А.Д. Аммосов. — Кольцово, 2004. — 115 с.
15. Бакасенас, Б. Особенности эпидемиологии клещевого энцефалита на территории Литвы / Б. Бакасенас, А. Варнас, Л. Банитиускене // Итоги науки и техники. Вирусология. — М., 1991. — Т. 24. — С 33–34.
16. Бощенко, Ю.А. Особо опасные, новые и вновь появляющиеся инфекции на Украине / Ю.А. Бощенко, Л.Я. Могилевский // Материалы междунар. конф. «Принципы и перспективы диагностики новых и вновь появляющихся инфекционных заболеваний». — Минск, 1997. — С. 37–45.
17. Жукова, Н.Г. Клещевой энцефалит в Томской области (этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика,лечение) / Н.Г. Жукова, Н.И. Команденко, Л.Е. Подоплекина. — Томск, 2002. — С. 73–81.

18. Клещевой энцефалит с молнеиносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента / В.В. Погодина [и др.] // Вопр. вирусологии, — 2013. — № 2. — С. 33–37/

19. Вотяков, В.И. Изучение роли перелетных птиц в заносе арбовирусов в западные районы Советского Союза / В.И. Вотяков, И.Н. Воинов // Материалы совещания по прикладной орнитологии. — М., 1975. — С.101–104.

20. Самойлова, Т.И. Изучение возможности заноса птицами вируса Западный Нил и его интродукции в местные биоценозы Беларуси / Т.И. Самойлова // Структурно-функциональное состояние биологического разнообразия животного мира Беларуси: тез. докл. VIII зоолог. науч. конф. / Отд-ие биол. наук НАНБ. Ин-т зоологии. — Минск, 1999. — С. 404–405.

21. Зильбер, Л.А. Предварительные итоги изучения энцефалита в Белоруссии / Л.А. Зильбер // Вопр. мед. вирусологии: сб. тр. Ин-та вирусологии им. Д.И. Ивановского. — М.: Изд-во АМН СССР, 1948. — Вып. 1. — С. 275–283.

22. Изучение ультравирусных энцефалитов. Сообщ. П. Географическое распространение и некоторые особенности эпидемиологии клещевого энцефалита человека в Европейской части ССР, Сибири и Казахстана / М.Н. Чумаков [и др.] // Невропатолог. и психиатр, — 1944. — Т. 13, № 2. — С. 20.

23. Протас, И.И. Западный клещевой энцефалит (клинический патогенез и нозологические аспекты): автореф. дис. … д-ра мед. наук: 14.00.13 / И.И. Протас; Ленинград. науч.-исслед. психоневролог. ин-т им. В.М. Бехтерева. — Л., 1987. — 28 с.

24. Вотяков, В.И. Клещевой энцефалит в Белоруссии (эпидемиологические, зоопаразитологические, клинические и экспериментальные исследования с материалами по оздоровлению природных очагов): дис. ... д-ра мед. наук / В.И. Вотяков. — Минск, 1965. — 554 с.

25. Гено- и фенотипическая гетерогенность вируса клещевого энцефалита и проблемы специфической профилактики / В.И. Вотяков [и др.] // Вакцины и иммунизация: материалы V Международ. форума по глобальной вакцинологии, Минск, 15–16 окт. 2001 г. — Минск, 2001. — С. 19.

26. Инфекция, вызываемая вирусом лихорадки Западного Нила, как клиническая и эпидемиологическая проблема / Ю.Я. Венгеров [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2000. — № 4. — С. 27–31.

27. Изоляция, антигенные свойства и биологическая характеристика вируса Западного Нила в Беларуси / Т.И. Самойлова [и др.] // Профилактика и лечение инфекц. и паразит. заболеваний. — Минск, 1995. — С. 116–121.

28. Новые арбовирусные инфекции, выявленные в Беларуси. Эпидемиология, лабораторная диагностика, профилактик: метод. рекоменд. — Минск: Хата, 1998. — 23 с.

29. Клинико-эпидемиологическая характеристика малоизвестных арбовирусных инфекций, встречающихся на территории СССР // Выявление циркуляции арбовирусов. Методы вирусологических и серологических исследований: метод. рекоменд. // Итоги науки и техники. Вирусология / ВИНИТИ. — М., 1991. — Т. 25. — С.83–96.

30. Самойлова, Т.И. Некоторые свойства штаммов нового для Беларуси арбовируса Батаи / Т.И. Самойлова, Л.А. Большунова // Современные проблемы эпидемиологии и эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями: материалы IX съезда работн. профилакт. медицины. — Минск, 1996. — С.198–211.

## ARBOVIRUSES AND ARBOVIRAL INFECTIONS IN BELARUS: STATE OF THE PROBLEM

**Samoilova T.I.**

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

The paper contains a brief overview of activities to identify and study of arboviruses and arboviral infections in Belarus.

**Keywords:** arboviruses, arboviral infections, Republic of Belarus.

Поступила 04.09.2013

## ЗАРАЖЕННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ ЗА ПОСЛЕДНИЕ ДВА ГОДА

**Самойлова Т.И., Залевская О.С., Климович О.В., Соглаева А.А., Яшкова С.Е., Веденьков А.Л.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье представлены результаты изучения зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Беларуси за 2011–2012 гг.

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

**Введение.** Ежегодно в Республике Беларусь проводятся исследования иксодовых клещей на зараженность их вирусом КЭ для оценки эпидситуации [1, 2]. Для изучения вирусофорности клещей в природных очагах в последние годы широко используется экспресс-метод иммуноферментного анализа (ИФА), имеющий высокую чувствительность и не уступающий методу биопробы на животных [3]. В данной работе приведены результаты исследования иксодовых клещей, собранных

на территории республики в 2011–2012 гг., на выявление антигена вируса КЭ с использованием иммуноферментного метода.

**Материал и методы.** Материалом для исследования являлись иксодовые клещи двух видов: *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, собранные на территории всех областей республики в 2011–2012 гг. Методом ИФА было исследовано 1861 экземпляров (228 биопроб) *I. ricinus* и 565 экземпляров (79 биопроб) *D.reticulatus* из природных очагов. Перед постановкой ИФА иксодовых клещей, подвергали первичной биологической обработке. Клещей распределяли по биопробам в зависимости от их вида, пола, стадии развития, степени насыщения. В одну биопробу брали 10–15 экземпляров голодных или полунапитавшихся самок; 10 голодных самцов; 2–5 напитавшихся самок или 50–100 нимф иксодовых клещей. Далее членистоногих отмывали фосфатным буферным раствором (pH 7,0), растирали в фарфоровой ступке и готовили суспензии. Приготовленные из клещей суспензии исследовали методом ИФА для выявления в них антигена вируса КЭ с использованием диагностических наборов фирмы Вектор-БЕСТ, согласно инструкции производителя. В дальнейшем биопробы, давшие положительный результат в ИФА на наличие антигена вируса КЭ, будут взяты для выделения возбудителя на культуре клеток СПЭВ и лабораторных животных.

**Результаты и их обсуждение.** В результате исследований иксодовых клещей в ИФА, собранных в природных очагах, антиген вируса КЭ в целом по республике за 2011–2012 гг. выявляли в клещах *I. ricinus* в 18,8%, а в *D. reticulatus* — 16,5% (таблица).

Как видно из таблицы, процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* за два года составил: по Витебской — 13,9, по Могилевской — 11,5, по Гродненской — 25,6, по Минской — 16,9, по Брестской — 25,0, по Гомельской — 10,0 и по г. Минску — 23,8%. В клещах *D. reticulatus* процент антигена вируса КЭ варьировал от 15,4 в г. Минске, до 23,5 — в Гродненской области. По Могилевской области показатель составлял 16,7%, по Гомельской — 17,34% по Минской — 16,7%.

Таблица — Данные по выявлению антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА (2011–2012 гг.)

| Области | Клещи по видам | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Ixodes ricinus* биопроб/экз. | Кол-во положительных | % положительных | *Dermacentor reticulatus* | Кол-во положительных | % положительных |
| Витебская | 43/370 | 6 | 13,9 | – | – | – |
| Могилевская | 26/245 | 3 | 11,5 | 12/107 | 2 | 16,7 |
| Гродненская | 43/375 | 11 | 25,6 | 17/119 | 4 | 23,5 |
| Минская | 53/338 | 9 | 16,9 | 6/16 | 1 | 16,7 |
| Брестская | 32/315 | 8 | 25,0 | 3/22 | – | – |
| Гомельская | 10/99 | 1 | 10,0 | 23/235 | 4 | 17,4 |
| Минск | 21/119 | 5 | 23,8 | 13/66 | 2 | 15,4 |
| Всего по РБ | 228/1861 | 43 | 18,8 | 79/565 | 13 | 16,5 |

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

Зараженность иксодовых клещей по годам приведена на рисунке.

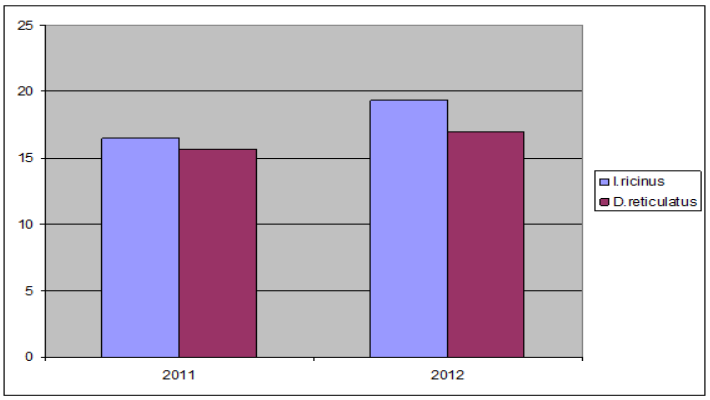



Рисунок — Динамика выявления антигена вируса КЭ в клещах методом ИФА по годам

Как видно из рисунка, зараженность иксодовых клещей *I.ricinus* и *D.reticulatus* вирусом КЭ была следующей: в 2011 г. — 16,5 и 15,6%, в 2012 г. — 19,3 и 17,0% соответственно.

Процент выявления антигена вируса КЭ в клещах *I. ricinus* в 2011 г. составил: по Гродненской (25,0%), Брестской (25,0%), Минской (15,0 ), Витебской (10,0%), Могилевской (9,1%) областям и г. Минску — 13,3%, в клещах *D.reticulatus* — по Гомельской области — 22,2%, по Могилевской — 11,1%.

В 2012 г. наиболее высокие показатели выявления антигена вируса КЭ в клещах *I.ricinus* были обнаружены в Гродненской (26,1%) и Брестской (25,0%) областях. В Минской области процент выявления антигена вируса КЭ составил 18,2, в Витебской — 17,4, Гомельской — 14,3, Могилевской — 13,3, г. Минске — 16,7%, а для клещей рода *D.reticulatus* — по Гродненской (23,5%), Гомельской (20,0%), Минской (16,7%) областям, г. Минску —15,4%.

В заключение следует отметить, что зараженность иксодовых клещей вирусом КЭ в Республике Беларусь за последние 2 года оставалась высокой и составляла для *I.ricinus* 18,8%, а для *D.reticulatus* — 16,5%. В то же время инфицированность клещей в предыдущие годы (2009–2010 гг.) была отмечена на уровне 15,5% для *I. ricinus* и 12,6% для *D. reticulatus*.

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

**Литература**

1. Изучение роли кровососущих комаров и мошек в циркуляции вирусов Западного Нила и серогруппы калифорнийского энцефалита на территории Беларуси / Т.И. Самойлова [и др.] // В сб.: Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология, иммунология), — М., 2005. — С. 64–70.

2. Самойлова, Т.И. Современное состояние проблемы арбовирусных инфекций в Республике Беларусь / Т.И. Самойлова // Вестн. Урал. гос. мед. акад. — Екатеринбург, 2010. — Вып. 21. — С. 133–141.

3. Методические рекомендации по выявлению циркуляции арбовирусов // Итоги науки и техники. Вирусология. — М.: ВИНИТИ, — 1991. — Т. 25. — 111 с.

## INVESTIGATION OF IXODOIDEA TICK'S INFECTIOUSNESS BY TICK-BORNE ENCEPHLITIS VIRUS IN BELARUS IN LAST 2 YEARS

**Samoilova T.I., Zalevskaya O.S, Klimovich O.V., Soglaeva A.A., Yashkova S.E., Vedenkov A.L.**

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

The results obtained in the study of ixodes tick's infectiousness by of tick-borne encephalitis virus in Belarus in 2011–2012 are presented in the paper.

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

Поступила 04.09.2013

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2013 И 2012 ГГ.

**Самойлович Е.О.[1], Шиманович В.П.[2], Семейко Г.В.[1], Свирчевская Е.Ю.[1], Ермолович М.А.[1]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ заболеваемости эпидемическим паротитом (эпидпаротитом) за период январь-август 2013 г. (при использовании вакцины против кори, паротита и краснухи, содержащей вакцинный штамм вируса паротита RIT 4385) в сравнении с аналогичным периодом 2012 г., когда применялась вакцина, содержащая вакцинный штамм Ленинград-Загреб. Проведенный анализ показал, что за анализируемый период 2013 г. было выявлено 2 случая эпидпаротита в сравнении с 48 случаями за аналогичный период 2012 г. Ни одного случая, имеющего вакцинное происхождение, в 2013 г. выявить не удалось, в то время как 31 из 48 (64,6%) случаев в 2012 г. были связаны с вакцинным штаммом Ленинград-Загреб.

**Ключевые слова:** эпидемический паротит, заболеваемость, лабораторная диагностика.

**Введение.** Благодаря введенному в конце 2010 г. в Республике Беларусь молекулярно-эпидемиологическому мониторингу эпидемического паротита (эпидпаротита), регистрация случаев этой инфекции в последние годы проводится на основании результатов лабораторного обследования пациентов. Как показали данные молекулярно-эпидемиологического мониторинга, выявленные в 2011–2012 гг. случаи эпидпаротита в основном были связаны с применявшейся в стране вакциной (являлись либо вакциноассоциированными, т. е. развившимися у реципиентов вакцины после ее введения, либо обусловленными горизонтальной передачей вакцинного штамма Ленинград-Загреб от недавно привитых детей, лицам, находившимся в близком контакте с ними). Принимая во внимание низкий (менее 1 на 100000 населения) уровень заболеваемости эпидпаротитом в стране [1], после консультаций с экспертным советом по иммунизации Министерством здравоохранения было принято решение о переходе на использование вакцины КПК, не содержащей вакцинного штамма Ленинград-Загреб.

**Целью** настоящего исследования являлся сравнительный анализ заболеваемости эпидпаротитом за период январь-август 2013 г. (использовалась вакцина против кори, паротита и краснухи, содержащая вакцинный штамм вируса паротита RIT 4385) в сравнении с аналогичным периодом 2012 г. (использовалась вакцина против кори, паротита и краснухи, содержащая вакцинный штамм вируса паротита Ленинград-Загреб).

**Материалы и методы.** Выявление подозрительных на эпидпаротит пациентов проводилось врачами поликлиник и больниц всех 7 регионов страны среди лиц, обратившихся за медицинской помощью. Клинические образцы (сыворотка крови, моча и/или носоглоточный смыв) от этих больных направлялись на исследование в Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Минск.

Как подозрительные на эпидпаротит рассматривались лица с острым проявлением одно- или двустороннего воспаления околоушных или других слюнных желез [2].

Критерии лабораторного подтверждения были следующими: выявление IgM антител к вирусу паротита в сыворотке крови; выявление нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках; определение РНК вируса паротита в клинических образцах (носоглоточный смыв или моча) методом ПЦР. Полученный по крайней мере в одном из исследований положительный результат свидетельствовал о лабораторном подтверждением диагноза эпидпаротит.

Выявление IgM антител к вирусу паротита проводили с использованием иммуноферментных тест-систем Serion ELISA classic Mumps IgM с абсорбентом ревматоидного фактора (Virion/Serion, Германия) или Enzygnost® Anti-Parotitis-Virus/IgM (Siemens, Германия).

Выделение вирусной РНК из НГС, мочи проводили, используя набор QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) или набор 5 MagMAX-96 Viral Isolation Kit (Ambion, США) с помощью автоматизированной станции для выделения нуклеиновых кислот MagMAX Express (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Обнаружение РНК вируса паротита выполняли методом ПЦР со специфическими праймерами к SH гену [3].

**Результаты и их обсуждение.** Проведенное сравнительное исследование показало, что в течение января–августа 2012 г. в Республике Беларусь было выявлено и направлено на лабораторное обследование 194 подозрительных на эпидпаротит пациентов, в течение января–августа 2013 г. — 114 подозрительных пациента. И в 2012, и в 2013 гг. пациенты были выявлены во всех 7 регионах страны.

Лабораторное исследование клинического материала в 2012 г. позволило подтвердить 48 случаев эпидпаротита. Лабораторно подтвержденные случаи выявлялись ежемесячно (январь — 5, февраль — 9, март — 5, апрель — 6, май — 3, июнь — 7, июль — 7, август — 6). На основании результатов лабораторных исследований и анализа эпидемиологических данных 20 из них были классифицированы как случаи, обусловленные горизонтальной трансмиссией вакцинного штамма Ленинград-Загреб, 11 — как вакциноассоциированные случаи у реципиентов вакцины, для 17 случаев (которые были лабораторно подтверждены только выявлением IgM антител, и эпидемиологические данные не указывали на возможность инфицирования за пределами страны) происхождение установить не удалось.

При лабораторном обследовании 114 подозрительных на эпидемический паротит пациентов в 2013 г. диагноз был подтвержден только у 2 человек. Первым заболевшим (апрель 2013 г.) оказался мужчина 26 лет, проживающий в г. Минске. Заболел после посещения России, где провел большую

часть инкубационного периода заболевания. Лабораторное подтверждение диагноза было основано на выявлении специфических IgM антител в сыворотке крови и значительном нарастании концентрации IgG антител в парных сыворотках, взятых на 5 и 9-й день после начала заболевания (1363 и 6754 мМЕ/мл соответственно). Выявить РНК вируса в носоглоточном мазке или моче с помощью ПЦР не удалось. Второй заболевший — ребенок 12 лет из г. Могилева, который во время инкубационного периода находился в Чехии. Диагноз подтвержден на основании выявления IgM антител в сыворотке крови и обнаружения РНК вируса паротита в носоглоточном смыве с помощью ПЦР.

**Выводы.** Представленные данные свидетельствуют о том, что в 2013 г. в сравнении с 2012 г. заболеваемость эпидпаротитом снизилась на 96%. Ни одного случая, имеющего вакцинное происхождение (вакциноассоциированный либо обусловленный горизонтальной трансмиссией вакцинного штамма), в 2013 г. выявить не удалось, в то время как 31 из 48 (64,6%) случаев 2012 г. были связаны с вакцинным штаммом Ленинград-Загреб. На основании эпидемиологических данных оба случая 2013 г. классифицированы как завозные случаи.

**Литература**

1. Шиманович, В.П. Влияние иммунизации на заболеваемость эпидемическим паротитом / В.П. Шиманович, Е.О. Самойлович // Здравоохранение. — 2011. — № 12. — С. 47–50.

2. Brief report: update: mumps activity – United States, January 1 — October 7, 2006 // Morb. Mortal. Weekly Rep. — 2006. — №. 5. — P. 1152–1153.

3. Investigation of mumps vaccine failures in Minsk, Belarus, 2001–2003 / A.V. Atrasheuskaya [et al.] // Vaccine. — 2007. — № 25. — P. 4651–4658.

## COMPARATIVE INVESTIGATION OF MUMPS INCIDENCE IN REPUBLIC OF BELARUS IN 2013 AND IN 2012

**Samoilovich E.O.[1], Shimanovich V.P.[2], Semeiko G.V.[1], Svirchevskaya E.Ju.[1], Yermalovich M.A.[1]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]State Republican Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus*

The aim of this work was comparative investigation of mumps incidence in Republic of Belarus for January-August of 2013 (when MMR vaccine contains mumps vaccine strain RIT 4385 was used) and the same period of 2012 (when MMR vaccine contains mumps vaccine strain Leningrad-Zagreb was used). The study showed that during 8 months of 2013 only 2 mumps cases were revealed (one — in April, other one — in August). Both cases were imported. For the same period of 2012 48 cases of mumps were reported, 31 of them were connected with Leningrad-Zagreb mumps strain (vaccine-associated cases in recipients of vaccine or cases associated with horizontal transmission of vaccine strain from vaccine recipients to their close contact).

**Keywords:** mumps, incidence, laboratory diagnostics.

Поступила 06.09.2013

## НАДЗОР ЗА ОСТРЫМИ ВЯЛЫМИ ПАРАЛИЧАМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ. 2011–2013 ГГ.

**Свирчевская Е.Ю.[1], Самойлович Е.О.[1], Ермолович М.А.[1], Семейко Г.В.[1], Ясинская Л.И.[2], Астапов А.А.[2]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** При обследовании 236 образцов стула, собранных от 118 детей с синдромом острого вялого паралича (ОВП) в течение 2011–2013 (8 мес.) гг., в культуре клеток было изолировано 6 полиовирусов (ПВ), 2 вируса Коксаки В5 и 8 аденовирусов. Молекулярно-генетическое изучение показало, что все ПВ являлись вакцинными. На основании клинико-эпидемиологических и вирусологических данных все случаи ОВП были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной этиологии.

**Ключевые слова:** полиомиелит, острый вялый паралич, полиовирус, неполиомиелитные кишечные вирусы.

**Введение.** Основная цель программы ликвидации полиомиелита — прекращение циркуляции диких полиовирусов (ПВ). С 1988 г. число случаев заболевания полиомиелитом в мире уменьшилось более чем на 99%. В 2013 г. эндемичная циркуляция диких ПВ сохранилась в трех странах: Афганистан, Нигерия и Пакистан. В течение января–марта 2013 г. в этих странах зарегистрировано 22 случая полиомиелита, вызванного диким вирусом [1]. Основу эпидемиологического надзора за полиомиелитом составляет надзор за случаями острого вялого паралича (ОВП) у детей в возрасте до 15 лет. Для обеспечения адекватного надзора ВОЗ разработаны основные критерии оценки качества проводимых мероприятий: выявления и регистрации случаев, сбора и доставки образцов стула в лабораторию, изоляции и идентификации ПВ, молекулярно-генетического изучения вирусов с целью определения их происхождения (вакцинный, дикий, вакцинородственный).

**Цель:** анализ случаев ОВП, выявленных в Республике Беларусь в течение 2011–2013 (8 мес.) гг., и идентифицировать вирусные агенты, выделенные от детей с синдромом ОВП.

**Материалы и методы.** В течение анализируемого периода в стране было выявлено 118 детей с синдромом ОВП. По две пробы стула от каждого ребенка (всего 236 образцов) были направлены на исследование в Национальный референс-центр по полиомиелиту.

Вирусологическое исследование образцов стула было выполнено с использованием трех перевиваемых линий клеток: L20B (генетически модифицированная линия мышиных клеток, экспрессирующая человеческий рецептор к ПВ), RD (клетки рабдомиосаркомы человека) и Hep2C (клетки эпидермоидной карциномы человека). Типирование изолированных в культуре клеток вирусов выполняли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ и энтеровирусам (производства Института общественного здравоохранения, Билтховен, Нидерланды) согласно рекомендациям ВОЗ [2].

Использование данных пулов сывороток позволяет идентифицировать ПВ всех трех серотипов, Коксаки B1-6, Кокасаки A9 и 20 различных серотипов Экхо вирусов. Вирусы, которые на культуре клеток Hep 2C давали типичный для аденовирусов цитопатический эффект (морфологически круглые клетки), исследовали с применением коммерческой диагностической ПЦР тест-системы «АмплиСенс Adenovirus-Eph» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Выделение вирусной РНК из культуральной жидкости проводили с использованием набора QIAamp DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Для выделения ДНК аденовирусов использовали набор реагентов «РИБО-преп», производства АмплиСенс (Россия).

Генетическая характеристика ПВ была получена на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) двух областей генома, кодирующих структурный белок VP1 (ПДРФ-1) и фрагмент вирусной полимеразы (ПДРФ-3D1). Выполнено полногеномное секвенирование двух полиовирусов и секвенирование участка генома, кодирующего VP3/VP1/2A белки вируса Коксаки B5, выделенных от детей с синдромом ОВП.

**Результаты и их обсуждение.** В соответствии с нормативными документами в республике было обеспечено проведение надзора за заболеваниями, протекающими с синдромом ОВП, у детей до 15 лет. Было выявлено и зарегистрировано 118 случаев заболевания: 2011 г. — 48, 2012 г. – 40, 2013 (8 мес.) г. – 30 (рисунок 1).

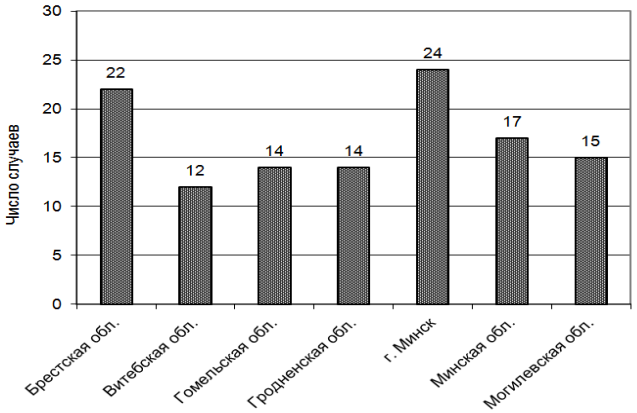



Рисунок 1 — Регистрация случаев ОВП в регионах РБ, 2011–2013 гг.

Пациенты с синдромом ОВП были выявлены во всех регионах республики: Брестская обл. — 22, Витебская — 12, Гомельская — 14, Гродненская — 14, г. Минск — 24, Минская — 17 и Могилевская — 15. Во всех регионах страны, как и в целом по республике показатель регистрации случаев ОВП соответствовал требуемому критерию ВОЗ (не менее 1 на 100 тыс. детей до 15 лет).

Анализ возрастной структуры детей с синдромом ОВП показал, что 57,6% (68/118) случаев ОВП было зарегистрировано среди детей старше 5 лет, при этом 64,7% (44/68) из них составляли дети в возрасте 12–14 лет. Доля детей в возрасте до 5 лет составила 42,4% (50/118). Среди них дети в возрасте 0–2 года составили 62% (31/50) (рисунок 2).

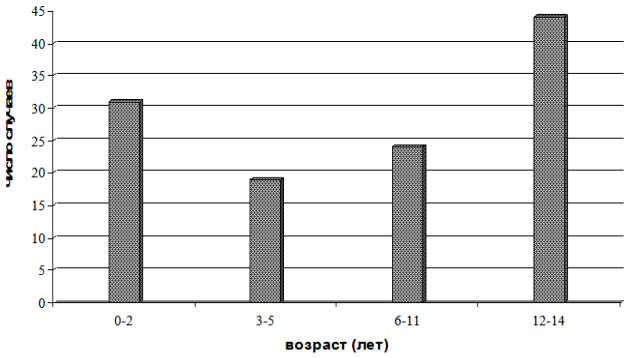



Рисунок 2 — Возрастное распределение случаев ОВП, зарегистрированных в РБ, 2011–2013 гг.

От всех заболевших детей в течение 14 дней от начала паралича были собраны по 2 пробы стула (с интервалом 24 ч), которые в течение 72 ч доставлены в Национальный референс-центр по полиомиелиту.

Выполненное вирусологическое исследование 236 проб стула, собранных у 118 пациентов, с использованием трех культур клеток позволило выделить вирусы от 8 детей. От трех детей были изолированы ПВ, от одного ребенка вирус Коксаки B5 и от 4 детей — аденовирусы (таблица). Вирусы были выделены при обследовании детей, заболевших в 2012 г. и в течение 8 мес. 2013 г. У детей, заболевших в 2011 г., ни ПВ, ни другие неполиомиелитные вирусы изолированы не были.

**Анализ случаев ОВП с выделением ПВ.** В двух из трех случаев ОВП ПВ были выделены их обеих проб стула, в одном случае — из одной (первой) пробы. У всех трех детей паралич развился после введения второй дозы оральной полиомиелитной вакцины (ОПВ), которой предшествовало введение трех доз инактивированной вакцины.

У 2 детей паралич развился на фоне сопутствующей тяжелой патологии, в одном случае — опухоли головного мозга, в другом — острого лимфобластного лейкоза [3]. Выделенные от обоих детей вирусы являлись ПВ3, при молекулярно-генетическом исследовании у всех штаммов была выявлена деаттенуирующая мутация нуклеотида 2493C на T (с заменой аминокислоты 6T на I).

У одного ребенка вирус также являлся двойным рекомбинантом Sab3 (4915–4917)-Sab1 (6970–6979) — Sab3. На основании полногеномного секвенирования было показано, что в целом уровень мутационной изменчивости вирусов был невысоким, составлял менее 1%, и изолированные ПВ несомненно являлись вакцинными. Оба ребенка неоднократно были осмотрены членами Республиканской комиссии по диагностике полиомиелита, и на основании клинико-лабораторных данных случаи ОВП были классифицированы как ОВП неполиомиелитной этиологии.

Третий случай ОВП с выделением ПВ (2013 г.) был зарегистрирован у ребенка с диагнозом травматический неврит малоберцового нерва. Из пробы стула, собранной на 4 день после вакцинации ОПВ, изолирован ПВ1. Из пробы, собранной на 5 день, была изолирована смесь ПВ1+2. Классификация данного случая не представляла особых сложностей. Имело место совпадения травматического поражения с недавней вакцинацией. На 60-й день от начала паралича остаточные явления отсутствовали. Случай был классифицирован как ОВП неполиомиелитной этиологии.

**Анализ случаев ОВП с выделением неполиомиелитных вирусов.** Неполиомиелитные вирусы были изолированы из обеих проб стула пяти детей: Коксаки B5 — от 1 ребенка (2 изолята), аденовирусы — от 4 детей (8 изолятов). Вирус Коксаки B был изолирован от ребенка в возрасте 3 лет из Брестской области с диагнозом острая полинейропатия с нижним вялым парапарезом. Заболева-

ние началось остро с повышения температуры тела до 39°С и катаральных явлений в зеве. На 7-й день от начала заболевания появилась слабость в ногах, из-за чего ребенок не смог самостоятельно ходить. Из проб стула, собранных на третий день от начала паралича, был выделен вирус Коксаки В5, который вероятнее всего и явился этиологическим агентом заболевания. При осмотре через 60 дней у ребенка наступило полное выздоровление. Выполненное секвенирование участка генома, кодирующего VP3/VP1/2A белки вируса Коксаки В5, показало, что наиболее близкородственным изолированному вирусу (98% гомологии) является изолят Коксаки В5, выделенный в 2011 г. в Китае в провинции Henan во время вспышки вирусных энцефалитов.

Таблица — Сведения о случаях ОВП с выделением вирусов, 2012–2013 гг.

| Эпидномер, возраст | Заключительный диагноз, дата заболевания | Вакцинация против полиомиелита | № образца | Выделен вирус |
|---|---|---|---|---|
| 107-12-02<br>2 года | Объемное образование головного мозга, мононейропатия правой ноги, 19.01.2012 | V5 (ОПВ)<br>23.12.2011 | 36674<br>36675 | ПВ3<br>ПВ3 |
| 206-12-23<br>2 года | Полинейропатия с нижним вялым парапарезом, 05.06.2012 | V5 (ОПВ)<br>31.05.2012 | 36747<br>36748 | ПВ3<br>отр. |
| 116-12-29<br>3 года | Полинейропатия с нижним вялым парапарезом, 09.08.2012 | V5 (ОПВ)<br>21.07.2011 | 36774<br>36775 | Коксаки В5<br>Коксаки В5 |
| 613-12-37<br>6 лет | Энцефалополинейропатия с прозопарезом, 02.11.2012 | V5 (ОПВ)<br>11.02.2008 | 36831<br>36832 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| 309-13-12<br>3 года | Травматическая нейропатия левого седалищного нерва 28.02.2013 | V2 (ИПВ)<br>03.10.2012 | 36938<br>36939 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| 617-13-16<br>9 лет | Полинейропатия с вялым нижним парапарезом, 20.03.13 | V6 (ОВП)<br>15.11.2010 | 36944<br>36945 | Аденовирус<br>Аденовирус |
| 402-13-22<br>2 года | Травматическая нейропатия правого малоберцового нерва, 23.04.2013 | V5 (ОПВ)<br>23.04.2013 | 36965<br>36966 | ПВ1<br>ПВ1+2 |
| 608-13-27<br>2 года | Полинейропатия с вялым тетрапарезом, 01.07.2013 | V5 (ОПВ)<br>16.01.2013 | 36987<br>36988 | Аденовирус<br>Аденовирус |

Аденовирусы были изолированы от 4 детей:

- от ребенка 6 лет из Минской области с диагнозом энцефаломиелополинейропатия с прозопарезом. У девочки через две недели после перенесенного ОРВИ развилась слабость мимической мускулатуры, появилось изменение походки, ребенок не смог самостоятельно стоять и ходить. На 60-й день от начала заболевания остаточных явлений не выявлено;
- от ребенка 3 лет из Гомельской области с диагнозом травматическая нейропатия левого седалищного нерва. Ребенок получал инъекции антибиотиков в связи с лечением пневмонии, после чего не смог опираться на ногу. При осмотре на 60-й день болезни остаточных явлений не выявлено;
- от ребенка 9 лет из Минской области с диагнозом полинейропатия с нижним парапарезом. После сна утром появилась слабость в ногах, не смог встать на ноги. За две недели до этого перенес ОРВИ (кашель, слабость, температура до 39°С). На 60-й день болезни при осмотре были выявлены остаточные явления;
- от ребенка 2 лет из Минской области с диагнозом полинейропатия с тетрапарезом. Ребенок заболел остро, когда появились боли и слабость в ногах. На 60-й день болезни при осмотре выявлены остаточные явления.

Республиканской комиссией по диагностике полиомиелита в 2011–2012 гг. на основании клинико-вирусологических данных была проведена заключительная классификация 88 случаев ОВП в соответствии с X Международной классификацией болезней (рисунок 3).

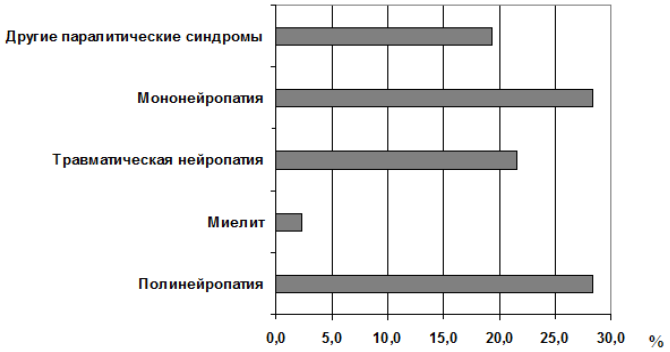



Рисунок 3 — Заключительная клиническая классификация случаев ОВП, Республика Беларусь, 2011–2012 гг.

Все 88 случаев ОВП были классифицированы как паралитические заболевания неполиомиелитной природы. Наиболее часто был выставлен окончательный диагноз полинейропатия (28,4%) и мононейропатия (28,4%). Значительную долю случаев составили травматические невриты — 21,6%. В число «других паралитических синдромов» вошли поражения нервных сплетений, хронические заболевания нервной системы и др.

Таким образом, при вирусологическом обследовании детей с синдромом ОВП в 2011–2013 гг. вирусные агенты были изолированы от 8 детей (6,8%): полиовирусы — от 3 детей, вирус Коксаки В5 — от 1 ребенка и аденовирус — от 4 детей. Частота изоляции ПВ составила 2,5% (6/236). Низкий процент изоляции ПВ, во-первых, объясняется тем, что первые три дозы вакцины против полиомиелита дети получают инактивированной вакциной, что в целом приводит к снижению циркуляции ПВ в популяции. Во-вторых, среди зарегистрированных случаев ОВП доля детей старше 5 лет составила 57,6% (68/118), при этом среди них детей в возрасте 12–14 лет было 64,7% (44/68). Известно, что 80–90% случаев паралитического полиомиелита возникают у детей до 5 лет. Как правило, у детей старшего возраста сформировался напряженный поствакцинальный иммунитет, который предотвращает размножение ПВ в кишечнике и его последующее выделение из организма.

Неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ) широко циркулируют в популяции. Циркуляция НПЭВ может быть бессимптомной, но может и вызывать заболевания, клинически схожие с полиомиелитом. В 2012 г., когда нам удалось выделить вирус Коксаки В5 от ребенка с ОВП, бессимптомная циркуляция этого вируса была выявлена при обследовании здоровых детей в детском доме г. Пинска Брестской области. Кроме того, в 2012 г. выросла частота изоляции этого вируса из сточных вод. Выделение Коксаки В5 от ребенка из г. Пинска с синдромом ОВП подтверждает тот факт, что у некоторых лиц инфицирование этим вирусом может вызывать заболевания с неврологической симптоматикой. По данным литературы, выделение неполиомиелитных энтеровирусов от детей с ОВП широко варьирует в зависимости от ряда факторов: климатические условия, плотность населения, уровень санитарно-гигиенической культуры и др. Наиболее часто от детей с ОВП выделяются вирусы Коксаки В и Экховирусы — Э6,Э11,Э13, менее часто Э4, Э14, Э25, Э30, Коксаки А и др. [4–7].

В нашем исследовании от 4 детей из проб стула были изолированы аденовирусы. У 3 детей заболевание протекало в тяжелой форме с наличием: у одного ребенка энцефалита с поражением мимической мускулатуры, у второго — с нижним вялым парапарезом и у третьего — с тетрапарезом. У четвертого ребенка аденовирус выделен на фоне лечения пневмонии, и паралич (травматический неврит седалищного нерва) явился следствием инъекции антибиотика. В последнее время в литературе появились данные, свидетельствующие о том, что аденовирус может вызывать поражения ЦНС. Наиболее часто встречаемыми при таком поражении были диагнозы: энцефалит, фебрильные судороги, менингит, эпилептические припадки [8]. При обследовании больных с синдромом ОВП в Малайзии из ткани мозга и из цереброспинальной жидкости был изолирован аденовирус 21 серотипа (группа В), что доказывает способность аденовирусов вызывать поражения ЦНС [9]. При исследовании 622 неполиовирусов, выделенных от больных с ОВП в Бразилии, Перу и Боливии, на культуре клеток Hep2C было изолировано 64 (10,3%) аденовируса. Молекулярно-генетическое исследование показало, что наиболее часто выявлялись аденовирусы, принадлежащие к группе В, се-

ротипов 3, 7 и 16 [10]. Роль аденовирусов (в частности группы В) в способности вызывать поражения нервной системы с наличием вялых параличей в настоящее время активно обсуждается.

**Выводы.** Данные, полученные при надзоре за ОВП в период 2011–2013 гг., убедительно свидетельствуют, что все зарегистрированные случаи ОВП были неполиомиелитной этиологии. Молекулярно-генетические исследования подтвердили отсутствие у заболевших диких или вакцинородственных полиовирусов. Роль неполиомиелитных вирусов в этиологии ОВП требует дальнейшего изучения.

**Литература**

1. Progress towards global interruption of wild poliovirus transmission, January 2012 — March 2013 // Weekly Epidemiol. Rep. — 2013. — № 18. — P. 181–188.
2. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. — Женева: ВОЗ, 2005. — 112 с.
3. Дифференциальная диагностика острых вялых параличей с выделением вакцинного полиовируса / Е.О. Самойлович [и др.] // Современные пробл. инфекц. патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: РНМБ, 2012. — Вып. 5. — С. 114–119.
4. Characterization of the Non-Polio Enterovirus Infections Associated with Acute Flaccid Paralysis in South-Western India / R. Laxmivandana [et al.] // PLoS One. — 2013. — № 8 (4).
5. Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan / M. Saeed [et al.] // BMC Infect .Dis. — 2007. — № 7. — P. 6.
6. Non-polio enteroviruses associated with acute flaccid paralysis (AFP) and facial paralysis (FP) cases in Romania, 2001–2008 / A. Persu [et al.] // Roum Arch. Microbiol. Immunol. — 2009. — Vol. 68, № 1. — P. 20–26.
7. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the Philippines / L.N. Apostol [et al.] // J. Med. Virol. — 2012. — Vol. 84, № 4. — P. 624–631.
8. Adenovirus infection associated with central nervous system dysfunction in children / Y.C. Huang [et al.] // J. Clin. Virol. — 2013. — Vol. 57, № 4. — P. 300–304.
9. Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Sarawak, Malaysia / M.N. Ooi [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 36, № 5. — P. 550–559.
10. Characterization of species B adenoviruses isolated from fecal specimens taken from poliomyelitis-suspected cases // J.P. Azevedo [et al.] // J. Clin. Virol. — 2004. — Vol. 31, № 4. — P. 248–252.

## ACUTE FLACCID PARALYSIS SURVEILLANCE IN BELARUS, 2011–2013

**Svirchevskaya E.Y.[1], Samoilovich E.O.[1], Yermalovich M.A.[1], Semeiko G.V.[1], Yasinskaya L.I.[2], Astapov A.A.[2]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

Investigation of 236 stool samples from 118 children with AFP revealed in 2011–2013 (8 months) resulted in isolation on cell culture 6 polioviruses, 2 Coxsakie virus B5 and 6 adenoviruses. Moleculogenetic study of polioviruses confirmed that all of them were vaccine. On the basis of clinical and virological data all AFP cases were classified as non-polio AFP.

**Keywords:** poliomyelitis, acute flaccid paralysis, poliovirus, non-polio enteric viruses.

Поступила 02.09.2013

## РЕЗУЛЬТАТЫ НАДЗОРА ЗА ЦИРКУЛЯЦИЕЙ ПОЛИОВИРУСОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, 2011–2012 ГГ.

**Свирчевская Е.Ю.[1], Самойлович Е.О.[1], Ермолович М.А.[1], Семейко Г.В.[1], Борисевич С.И.[2], Головнева Г.П.[2], Думова С.А.[2], Крушинская Т.Г.[2], Цеханович Н.С.[2], Лосева Е.М.[2], Задорожная Н.Н.[3]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Областные ЦГЭиОЗ, Беларусь;*

*[3]Минский городской ЦГЭ, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе представлены результаты исследования 192 цитопатических агентов, изолированных в рамках выполнения надзора за циркуляцией полиовирусов. Из них 85 (44,3%) явля-

лись полиовирусами, в остальных 107 образцах было идентифицировано 86 неполиоэнтеровирусов (8 — вирусы Экхо, 62 — вирусы Коксаки В1-6, 16 — нетипируемые энтеровирусы) и 21 аденовирус. Молекулярно-генетическое исследование полиовирусов, выполненное с помощью рестрикционного анализа области генома, кодирующей основной структурный белок VP1 и белок 3D полимеразы, показало, что все они имели вакцинное происхождение. Анализ выделенных неполиовирусов показал, что в 2012 г. в сравнении с 2011 г. существенно выросла доля вируса Коксаки В, в то время как доля аденовирусов снизилась.

**Ключевые слова:** полиомиелит, надзор, полиовирусы, неполиомиелитные энтеровирусы, аденовирусы.

**Введение.** Несмотря на достигнутые успехи в борьбе с полиомиелитом, в мире ежегодно регистрируются случаи паралитического полиомиелита, вызванные диким полиовирусом (ПВ). В 2013 г. три страны (Нигерия, Афганистан, Пакистан) остаются эндемичными по этой инфекции и являются источником импортации диких полиовирусов в другие страны [1].

Вспышка полиомиелита в Таджикистане, зарегистрированная весной и летом 2010 г., резко повысила вероятность появления новых очагов заболевания в других странах Европейского региона ВОЗ. По оценкам региональной комиссии, в настоящее время в зоне наибольшего риска по полиомиелиту, помимо Таджикистана, находятся семь государств региона: Узбекистан, Украина, Грузия, Турция, Босния и Герцеговина, Черногория и Мальта [2].

Еще одной проблемой, осложняющей программу эрадикации полиомиелита, является существование вакцинородственных полиовирусов (ВРПВ), которые в значительной степени дивергировали от вакцинных штаммов Себина и способны вызывать развитие паралитического полиомиелита [3, 4]. Вспышки паралитического полиомиелита, вызванные ВРПВ, были отмечены в Египте, Гаити, Доминиканской Республике, Филиппинах, Мадагаскаре, Китае, Индонезии, Нигерии, Индии, Камбодже и др. [5, 6].

Одним из основных компонентов надзора за полиомиелитом в контексте инициативы его глобальной ликвидации является надзор за заболеваниями, протекающими с синдромом острого вялого паралича (ОВП) у детей до 15 лет. Важной составной частью надзора за полиомиелитом является контроль за циркуляцией полиовирусов (ПВ), целью которого является обнаружение в различных источниках как диких, так и измененных ВРПВ.

В качестве дополнительного элемента системы эпидемиологического надзора за полиомиелитом и острыми вялыми параличами в постсертификационный период в настоящее время рассматривается надзор за энтеровирусными инфекциями, который включает мониторинг циркуляции энтеровирусов среди населения и в окружающей среде.

При осуществлении надзора за циркуляцией энтеровирусов в объектах окружающей среды в Израиле в течение февраля-августа 2013 г. в 67 образцах сточной воды из 24 регионов страны был изолирован дикий ПВ серотипа 1 (ПВ1). Кроме этого, дикий ПВ1 был выявлен у 27 здоровых детей в возрасте до 9 лет и у одного взрослого. Все обследованные были вакцинированы соответственно своему возрасту. Случаи паралитического полиомиелита не регистрировались. ВОЗ подчеркивает, что риск распространения дикого ПВ из Израиля в другие страны остается очень высоким, поскольку циркуляция вируса сохраняется длительный период [7].

В соответствии с приказом МЗ РБ № 912 от 05.12.2006 г. «О совершенствовании эпидемиологического надзора за полиовирусной инфекцией в постсертификационном периоде» в Республике Беларусь наряду с выявлением и вирусологическим обследованием детей с ОВП проводится мониторинг циркуляции ПВ среди населения, который включает обследование различных групп детей (здоровых, больных ОКИ, ОРВИ, серозными менингитами и менингоэнцефалитамии, другими заболеваниями), а также исследование сточных вод.

**Цель:** анализ результатов идентификации и молекулярно-генетического исследования цитопатических агентов, изолированных из различных источников при выполнении надзора за полиовирусной инфекцией в Республике Беларусь в 2011–2012 гг. Поскольку главной задачей надзора за полиомиелитом является не пропустить дикий ПВ среди всей массы циркулирующих кишечных вирусов, основное внимание в нашей работе было сосредоточено на характеристике полиовирусов.

**Материалы и методы.** В течение анализируемого периода времени (2011–2012 гг.) с использованием вирусологических, серологических и молекулярных методов проведена идентификация 192 цитопатических агентов (ЦПА), выделенных региональными вирусологическими лаборатори-

ями страны и направленных в Национальный референс-центр по полиомиелиту для дальнейшего изучения.

Вирусологическое исследование образцов было выполнено с использованием трех перевиваемых линий клеток: L20B (генетически модифицированная линия мышиных клеток, экспрессирующая человеческий рецептор к ПВ), RD (клетки рабдомиосаркомы человека) и Hep2C (клетки эпидермоидной карциномы человека).

Типирование изолированных ПВ и неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) выполняли в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ и энтеровирусам производства Института общественного здравоохранения, Билтховен, Нидерланды, согласно рекомендациям ВОЗ [8].

Поскольку используемый набор диагностических сывороток к энтеровирусам не дает возможности определить все существующие серотипы, идентификацию нетипируемых цитопатогенных агентов выполняли с использованием коммерческих ПЦР-тест-систем («АмплиСенс Enterovirus-FL» и «АмплиСенс ОКИ скрин-FL», Россия). Идентификацию аденовирусов проводили с применением коммерческой диагностической ПЦР-тест-системы производства «АмплиСенс Adenovirus-FPh» (Россия). Выделение вирусной ДНК/РНК из культуральной жидкости проводили с использованием набора QIAamp DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия)

Генетическая характеристика ПВ была получена на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) двух областей генома, кодирующих структурный белок VP1 (ПДРФ-1) и фрагмент вирусной полимеразы (ПДРФ-3D1).

Результаты и обсуждение. Серотипирование 192 ЦПА, выделенных областными вирусологическими лабораториями в рамках слежения за циркуляцией ПВ, показало, что 85 (44,3%) из них являлись ПВ, 107 — неполиомиелитными вирусами (таблица 1).

Таблица 1 — Результаты типирования ЦПА, доставленных на подтверждение региональными ЦГЭ, 2011–2012 гг.

| Регион | Полиовирусы | | | | | | | Число изолятов | Число образцов |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PV1 | PV2 | PV3 | Ad | CoxsB | Echo | NTEV | | |
| г. Минск | 4 | 9 | 7 | 9 | 17 | 3 | 7 | 56 | 54 |
| Брестская обл. | 6 | 10 | 7 | 5 | 31 | – | – | 59 | 54 |
| Витебская обл. | 10 | 8 | 7 | 2 | 1 | – | – | 28 | 21 |
| Гомельская обл. | 9 | 13 | 2 | – | 7 | – | 1 | 32 | 27 |
| Гродненская обл. | – | – | – | 2 | 3 | – | 1 | 6 | 6 |
| Минская обл. | 2 | 3 | 4 | 3 | – | 5 | 6 | 22 | 19 |
| Могилевская обл. | 3 | 5 | 2 | | 3 | | 1 | 14 | 10 |
| Всего | 34 | 48 | 29 | 21 | 62 | 8 | 16 | 217 | 192 |

Из 85 образцов, содержащих ПВ, в 61 присутствовали монотипы, в 24 — смесь ПВ. После разделения смесей всего было получено 111 изолятов ПВ, в т. ч.: ПВ1 — 34, ПВ2 — 48 и ПВ3 — 29. ПВ были выделены от здоровых детей (26), от детей с ОРИ (15), от детей с ОКИ (32), от детей с другими заболеваниями (8) и из сточной воды (30) (рисунок 1).

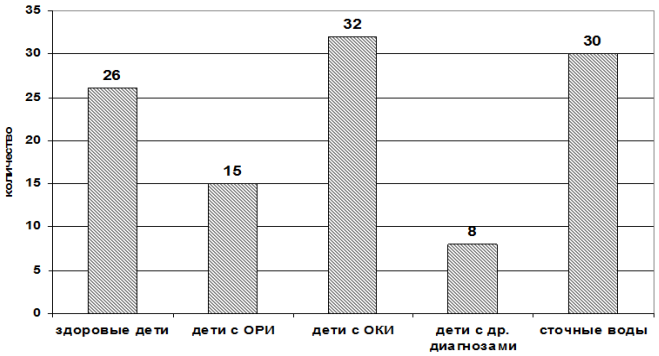



Рисунок 1 — Выделение полиовирусов из различных источников

Анализ изолированных ПВ показал, что наиболее часто из всех исследуемых источников, за исключением детей с ОКИ, выделялись ПВ2. Наибольшее число изолятов ПВ2 было получено из образцов сточный воды, от детей с ОКИ и здоровых детей — 18, 10 и 10 соответственно. Все серотипы ПВ у детей выделись практически с одинаковой частотой, что может свидетельствовать о том, что дети были недавно вакцинированы. В соответствии с действующим приказом № 192 «О совершенствовании эпидемиологического надзора за полиовирусной инфекцией в постсертификационном периоде в Республике Беларусь» в основном обследуются дети в возрасте до 2 лет. В течение первых двух лет жизни, согласно календарю прививок, дети получают 2 дозы ОПВ (в возрасте 18 и 24 мес.). Из сточной воды было изолировано 7 ПВ1, 18 ПВ2 и 5 ПВ3. Из образцов сточных вод наиболее часто выделялся ПВ2, который составил 60% от всех обнаруженных там ПВ (рисунок 2).

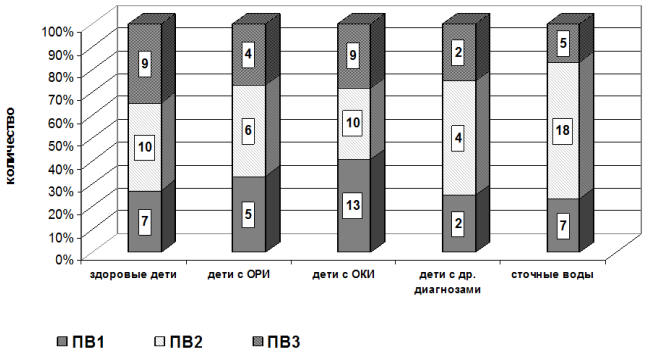



Рисунок 2 — Типовая принадлежность ПВ, изолированных в Беларуси из различных источников в 2011–2012 гг.

Молекулярно-генетическое исследование, выполненное с помощью рестрикционного анализа области генома, кодирующей структурный белок VP1 (ПДРФ-1) и фрагмент вирусной полимеразы (ПДРФ-3D1) показало, что все изоляты ПВ имели вакцинное происхождение.

Среди 107 неполиомиелитных кишечных вирусов методом серотипирования в реакции нейтрализации было идентифицировано 62 вируса, относящиеся к вирусам Коксаки В, и 8 — к вирусам Эхко. Эхковирусы были представлены тремя серотипами: Эхко 6 (4 изолята), Эхко 11 (3 изолята), Эхко 30 (1 изолят). В 21 случае в культуре клеток Hep2C цитопатический эффект был представлен в виде крупных клеток округлой формы, что считается наиболее характерным для аденовируса. При исследовании вируссодержащей культуральной жидкости в диагностической ПЦР к аденовирусам во всех образцах была выявлена ДНК аденовируса. В оставшихся 16 изолятах при исследовании методом ПЦР была выявлена РНК энтеровируса. Поскольку ранее выполненное серотипирование в реакции нейтрализации не позволило идентифицировать серотип, их отнесли в группу нетипируемых энтеровирусов (НТЭВ).

Анализ полученных изолятов показал, что в 2012 г. число выделенных неполиомиелитных вирусов было существенно выше в сравнении с 2011 г. (80 и 27 соответственно). В 2011 г. доля аденовирусов и вирусов Коксаки В среди всех неполиовирусов составила 40,7 и 25,9% соответственно. Аденовирусы выделялись из всех исследованных источников, вирусы Коксаки В были изолированы в основном из образцов сточной воды (таблица 2).

Таблица 2 — Выделение неполиовирусов из различных исследованных источников, 2011–2012 гг.

| Источник выделения | 2011 | | | | 2012 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | адено | Коксаки В1-6 | Эхко | НТЭВ | адено | Коксаки В1-6 | Эхко | НТЭВ |
| Здоровые дети | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | 25 | 7 | 6 |
| Дети с ОРИ | 3 | 1 | | 1 | 3 | 5 | – | – |
| Дети с ОКИ | 3 | – | | 1 | 2 | 5 | – | – |
| Дети с серозным менингитом | – | – | | 1 | – | 5 | – | 1 |
| Дети с др. диагнозами | 1 | – | | – | – | 1 | – | – |
| Сточные воды | 3 | 5 | | 2 | 3 | 14 | – | 1 |
| Всего | 11 (40,7%) | 7 (25,9%) | 1 (3,7%) | 8 (29,7%) | 10 (12,5%) | 55 (68,7%) | 7 (8,8%) | 8 (10%) |

В 2012 г. картина выделеных вирусов изменилась. Число вирусов Коксаки В увеличилось более чем в 2,5 раза, и их доля среди всех полученных изолятов составила 68,7% (55/80), при этом количество аденовирусов снизилось более чем в 3 раза, и их доля составила 12,5% (10/80) (рисунок 3).

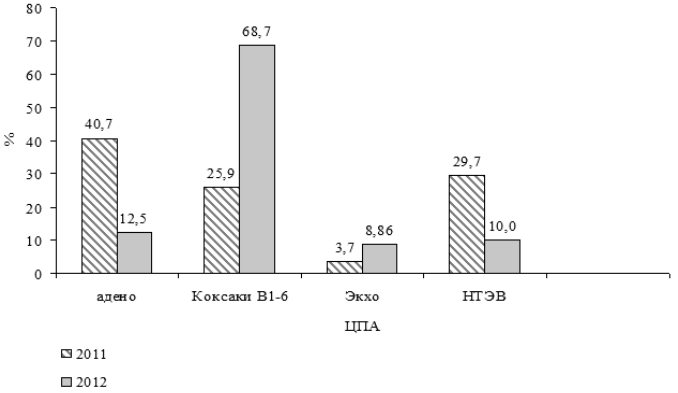



Рисунок 3 — Выделяемость неполиовирусов в рамках надзора за циркуляцией полиовирусов, 2011–2012 гг.

В 2012 г. вирусы Коксаки В были получены из всех исследуемых источников, при этом наибольшее число было изолировано от здоровых детей — 45,5% (25/55) и из сточных вод — 25% (14/55). Кроме этого, Коксаки В вирусы были также изолированы и от детей с серозным менингитом (5/55, 9,1%) (таблица 2).

Активная циркуляция вируса Коксаки В5 была выявлена при обследовании здоровых детей г. Пинска Брестской области в детском закрытом коллективе. В этот же период времени в Брестской области вирус Коксаки В5 выделялся и от больных с диагнозами серозный менингит, ОКИ, ОРИ.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют об отсутствии циркуляции на территории Беларуси диких и вакцинородственных ПВ. Поскольку для вакцинации детей все еще используется оральная полиомиелитная вакцина (в комбинации с инактивированной вакциной), вакцинные ПВ выделяются как от здоровых детей, так и от детей с другими диагнозами с одинаковой частотой, в то же время из проб сточной воды наиболее часто выделялись ПВ2. При изучении неполиовирусов, выделенных в рамках надзора за полиовирусной инфекцией, были изолированы вирусы Коксаки В, Экхо и аденовирусы. В 2012 г. произошло значительное увеличение в циркуляции вирусов Коксаки В, которые были выделены как от здоровых детей, так и от детей с ОКИ, ОРИ и серозным менингитом.

**Литература**

1 Полиомиелит. Информационный бюллетень ВОЗ, 31 авг., 2012 г.

2 ВОЗ опасается возвращения полиомиелита в страны Европейского региона // Новости медицины. — Режим доступа: http://www.evanmed.ru/companent/content/article/ 1-latest-news/46-2012-07-26-09-43-22.

3 Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication / O.M. Kew [et al.] // Ann. Rev. Microbiol. — 2005. — Vol. 59. — P. 587–635.

4 Laboratory surveillance for wild and vaccine-derived polioviruses, January 2007 — June 200 8// WHO. Weekly Epidemiol. Rec. — 2008. — Vol. 83. — P. 321–328.

5 A large vaccine-derived polioviruses outbreak on Madura Island-Indonesia, 2005 / Estivaris C.F. [et al]. // J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 197, № 3 – P. 347-354

6 Circulation vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge / O.M. Kew [et al.] // Bull. WHO. — 2004. — Vol. 82, № 1. – P. 16–23.

7 Poliovirus detected from environmental samples in Israel – update / WHO / Global and Response (GAR). — Mode of access: http://www.who.int/csr/don/2013_08_15/en/index.html.

8 Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. — Женева: ВОЗ, 2005. — 112 с.

## MONITORING OF POLIOVIRUS CIRCULATION IN REPUBLIC OF BELARUS, 2011–2012

**Svirchevskaya E.Y.[1], Samoilovich E.O.[1], Yermalovich M.A.[1], Semeiko G.V.[1], Borisevich S.I.[2], Golovnyova G.P.[2], Dumova S.A.[2], Krushinskaya T.G.[2], Tsehanovich N.S.[2], Loseva E.M.[2], Zadorozhnaya N.N.[3]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Regional Centers for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Belarus;*

*[3]Minsk City Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus*

Investigation of 192 cytopathogenic agents, isolated in a framework of monitoring of poliovirus circulation showed that 85 (44.3%) of them were polioviruses, among other 107 agents 86 were identified as non-polio enteroviruses (8 — Echo viruses, 62 — Coxsakie B viruses, 16 — untypable enteroviruses) and 21 adenoviruses. Moleculo-genetic investigation of polioviruses in RFLP of VP1 and 3D genomic regions showed that all of them had vaccine origin. The analysis of isolated non-polio enteroviruses revealed that in 2012 proportion of Coxsakie B viruses was increased and of adenoviruses was decreased compared with 2011.

**Keywords:** poliomyelitis, surveillance, polioviruses, non-polio enteroviruses, adenoviruses.

Поступила 02.09.2013

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РОТАВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР: ВОЗМОЖНОСТИ, ПРОБЛЕМЫ, ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

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

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Наиболее распространенным методом генотипирования ротавирусов в настоящее время является полугнездовая мультиплексная ОТ-ПЦР, которая широко описана в литературе, и позволяет установить генотип у большой доли исследуемых образцов, но в то же время данный метод разработан для выявления широко распространенных генотипов (G1-4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9]). Для установления генотипа нетипируемых с помощью полугнездовой мультиплексной ОТ-ПЦР штаммов, подтверждения результатов, полученных в ОТ-ПЦР, если генотип для страны или региона оказался новым или комбинация P- и G-типов оказалась необычной, для наблюдения за изменчивостью ротавирусов и оценки эффективности использования праймеров необходимо выполнять секвенирование VP4 и VP7 генов.

**Ключевые слова:** ротавирусы, генотипы, мультиплексная ПЦР, секвенирование, праймеры.

**Введение.** Острые кишечные инфекции занимают одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний, уступая по частоте лишь гриппу и острым респираторным заболеваниям. Ротавирусы группы А (семейство *Reoviridae*, род *Rotavirus*) являются наиболее распространенной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей младшего возраста [1]. Ежегодно в мире регистрируется более 100 млн случаев ротавирусного гастроэнтерита, являющегося причиной 2 млн госпитализаций и около 600 тыс. смертей детей в возрасте до 5 лет [2].

Геном ротавируса представлен 11 сегментами двухцепочечной РНК, кодирует 6 структурных и 6 неструктурных белков. Классификация ротавирусов группы А основана на определении антигенной специфичности поверхностных белков: VP7 (определяет G тип) и VP4 (P тип). Но так как определение серотипа ротавируса является достаточно трудоемкой задачей и требует соответствующих реагентов (моноклональных антител), при характеристике вируса в настоящее время определяют его генотип.

Наиболее распространенным методом генотипирования ротавирусов в настоящее время является полугнездовая мультиплексная ОТ-ПЦР. Комбинации праймеров и условия проведения реакции описаны в литературе [3, 4]. Применение данного метода позволяет определить генотип ротавирусов у большой доли исследуемых образцов, но в то же время данный метод разработан преимущественно для выявления широко распространенных генотипов (G1-4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9]). В том случае, когда G-тип установить не удается, используют альтернативный набор праймеров, по-

зволяющий выявлять также генотипы G8 и G12 [5]. Если все предпринятые усилия не дают результата, при типировании таких вирусов применяют секвенирование.

Исследование генетического разнообразия циркулирующих в г. Минске ротавирусов, проведенное в 2010–2011 гг., показало, что более 90% из них составляли ротавирусы широко распространенных генотипов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8]. При этом доминирующим генотипом в 2010 г. являлся G4P[8] (его доля в циркуляции составляла 42%), а в 2011 г. — генотип G3P[8] (65%). Наряду с вышеперечисленными выявлялись и редко встречающиеся генотипы.

Так, при генотипировании ротавирусов было выявлено 2 штамма (по одному в 2010 и 2011 гг.), у которых при использовании основного набора праймеров удалось установить только P-генотип — P[4]. Типирование с применением альтернативного набора праймеров позволило определить генотип обоих вирусов как G12P[4]. Вирусы были выделены от детей в возрасте 5 мес. (BLR/RoV-2581, 2010 г.) и 2 лет (BLR/RoV-3935, 2011 г.), проживающих в г. Минске, госпитализированных с диагнозом острый гастроэнтерит. В обоих случаях имели место типичные клинические проявления ротавирусной инфекции. Так как в литературе описан только один ротавирус генотипа G12P[4] [6], а в Беларуси ранее вирусы генотипа G12 не выявлялись, то несомненно представляло интерес провести секвенирование этих вирусов.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили образцы стула двух детей с лабораторно подтвержденной ротавирусной инфекцией, госпитализированных в детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска в 2010 и 2011 гг.

Выделение РНК ротавирусов проводили из 10%-й суспензии стула с использованием набора 5X MagMAX-96 Viral Isolation kit (Ambion, США) на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот MagMAX Express (Applied Biosystems, США).

С целью получения фрагментов генома для секвенирования выполняли ОТ-ПЦР в один раунд с использованием набора QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Германия), содержащего смесь ферментов: обратные транскриптазы Omniscript и Sensiscript и HotStarTaq ДНК полимеразу. Для амлификации фрагмента гена VP7 использовали праймеры 9con1L и VP7-R [3], для амплификации фрагмента гена VP4 — праймеры con3 и con2 [4]. Реакцию проводили в следующих условиях: обратная транскрипция: 30 мин при 42°C, денатурация смеси обратных транскриптаз и активация полимеразы — 15 мин при 95°C и 40 циклов амплификации. Каждый цикл включал: денатурацию при 94°C — 30 с, отжиг праймеров при 42°C — 30 с, элонгацию при 72°C — 45 с. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением красителя GelStar 10000X (Lonza, США) для визуализации ДНК.

Амплифицированные фрагменты ДНК вырезали из геля, очищали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия) и секвенировали с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) на капиллярном секвенаторе Avant 3100 (Applied Biosystems, США).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 5. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограмм оценивали методом псевдореплик (анализировались 1000 псевдореплик).

**Результаты и их обсуждение.** В результате секвенирования ПЦР-продуктов первого раунда и последующего выравнивания нуклеотидных последовательностей были получены фрагменты VP4 гена длиной 801 п.н. и VP7 гена длиной 815 п.н. для штамма BLR/RoV-2581; и фрагменты длиной 725 и 817 п.н. VP4 и VP7 генов для штамма BLR/RoV-3935 соответственно.

Для анализа полученных результатов использовали Международную базу данных GenBank, в которой с помощью программы BLAST осуществляли поиск последовательностей, наиболее близких по нуклеотидному составу полученным нами. Анализ показал, что оба вируса принадлежали к генотипу G8P[4].

При сравнении полученных нуклеотидных последовательностей штаммов BLR/RoV-2581 и BLR/RoV-3935 между собой установлено, что они не идентичны. Различия между ними составило 0,7% (6 из 811 п.н.) для фрагмента VP7 гена и 0,1% (1 из 725 п.н.) — для VP4 гена.

Согласно данным литературы, впервые ротавирусы генотипа G8 были выявлены у детей с диареей в Индонезии в 1978–1981 гг. [7] и в последующие годы их спорадически обнаруживали по всему миру: в Европе, Бразилии, Австралии. За последние 10 лет вирусы генотипа G8 широко распространены в Африке — доля их в циркуляции в течение ряда лет достигала 20% [8]. На территории Беларуси ротавирусы этого генотипа выявлены впервые.

Так как ротавирусы генотипа G8P[4] имеют распространение во многих регионах, представлялось важным определить филогенетические взаимоотношения вирусов, выявленных в Беларуси, с вирусами, циркулирующими в других станах.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP7 показал, что выделенные в Беларуси ротавирусы BLR/RoV-2581 и BLR/RoV-3935 кластеризуются со штаммом GER1H-09, выявленным в Германии в 2009 г. [9] и штаммами US09Ro045, US09Ro103 и US09Ro104, выявленными в США в том же 2009 г. Ротавирусы, циркулировавшие в странах Африки и Словении, образуют обособленный кластер (рисунок 1).

Построенная на основании анализа VP4 гена филограмма (рисунок 2) также свидетельствует о близости исследуемых белорусских штаммов к штаммам, выделенным в Германии и США.

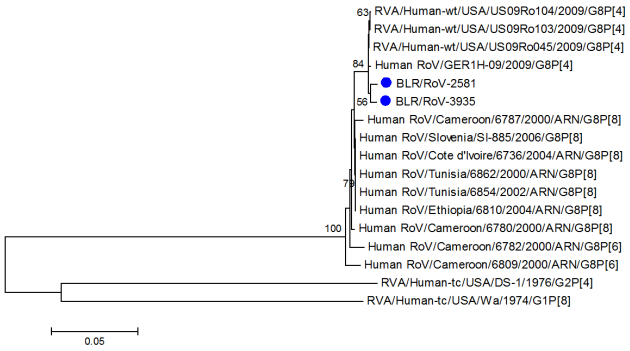



Рисунок 1 — Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP7 (811 нуклеотидов) 2 ротавирусов, выявленных в Республике Беларусь, и ротавирусов генотипа G8 из разных стран мира с использованием алгоритма neighbor-joining. Шкала отражает эволюционное расстояние

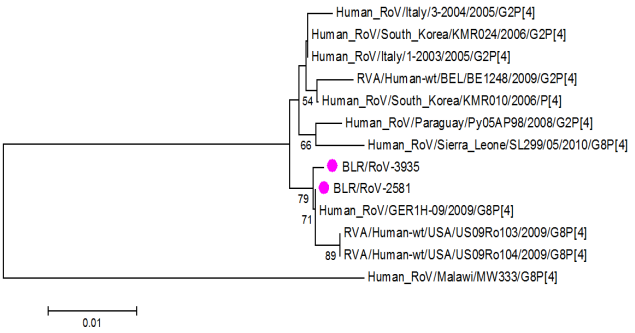



Рисунок 2 — Филограмма, построенная на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента VP4 гена (725 нуклеотидов) 2 ротавирусов, выявленных в Республике Беларусь, и ротавирусов генотипа P[4] из разных стран мира с использованием алгоритма neighbor-joining. Шкала отражает эволюционное расстояние

С целью установления причин ошибочного типирования ротавирусов BLR/RoV-2581 и BLR/RoV-3935 как G12 при использовании полугнездовой мультиплексной ОТ-ПЦР, тогда как разультаты секвенирования показали их принадлежность к генотипу G8, были проанализированы последовательности специфических праймеров для определения G12 и G8 генотипов (G12B и aAT8, соответственно) и области генома, с которыми данные праймеры связывались при амплификации.

Как известно, ключевым моментом ПЦР является специфическое связывание праймера с ДНК-матрицей, при этом для эффективной работы ДНК-полимеразы важно точное спаривание именно 3’-конца праймера с нуклеотидной последовательностью. В результате выравнивания полученных нами нуклеотидных последовательностей гена VP7 и праймеров оказалось, что различия между праймером G12B и областью его связывания составили 3 нуклеотида, при этом 3’-конец праймера G12B (длиной 10 нуклеотидов) был гомологичен последовательностям выявленных штаммов генотипа G8 (рисунок 3).

Анализ области связывания с праймером aAT8 показал наличие 4 замен, 2 из которых локализовались именно на 3’-конце (рисунок 4). Наиболее вероятно, это и являлось причиной преимущественного связывания праймера G12B, предназначенного для выявления генотипа G12, с нуклеотидной последовательностью ротавируса генотипа G8. Похожая ситуация была описана Aladin F. [10] при типировании ротивирусов в Региональной референс-лаборатории в Лондоне. Результатом про-

веденного ими исследования стала коррекция праймеров, использовавшихся в европейском регионе для генотипирования ротавирусов генотипов G8 и G12.

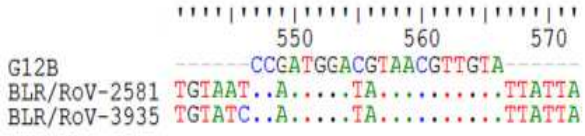



Рисунок 3 — Сравнение нуклеотидных последовательностей ротавирусов генотипа G8 с праймером для типирования G12 генотипа. Точки обозначают совпадения нуклеотидов последовательности с нуклеотидами праймера

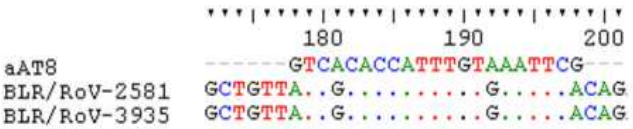



Рисунок 4 — Сравнение нуклеотидной последовательности G8-штамма ротавируса с праймером для типирования G8 генотипов. Точки означают совпадения нуклеотидов последовательности с нуклеотидами праймера

Так как ранее в Беларуси ротавирусы генотипа G8 не выявлялись, для типирования использовались праймеры, рекомендованные Глобальной референс-лабораторией по ротавирусам (Атланта, США) и широко применяемые в большинстве стран мира. На основании результатов наших исследований будет проведена коррекция праймеров для генотипирования ротавирусов, имеющих генотипы G8 и G12.

В целом же хотя секвенирование и является трудоемким методом исследования, оно является очень эффективным, во-первых, для генотипирования нетипируемых штаммов, во-вторых, подтверждения результатов, полученных в ПЦР, если генотип для страны или региона оказался новым или комбинация P- и G-типов оказалась необычной, в-третьих, для наблюдения за изменчивостью ротавирусов и оценки эффективности использования праймеров.

**Выводы.** На территории Беларуси выявлены штаммы ротавирусов с редким генотипом G8P[4], не встречавшиеся ранее. Филогенетический анализ показал, что они кластеризуются со штаммами, циркулировавшими в Германии и США. Результаты изучения праймеров показали, что вирусы генотипа G8, выделенные в Беларуси, имеют определенные особенности и требуют коррекции праймеров для их типирования.

**Литература**

1. World Health Organization. Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin. — 2013. — Vol. 7. — 11 p.

2. Global illness and deaths caused by Rotavirus / U. Parashar [et al.] // Emerg. Inf. Dis. — 2003. — Vol. 9, № 2. — P. 565–540.

3. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction / J.R. Gentsch [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30, № 6. — P. 1365–1373.

4. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India / B.K. Das [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Vol. 32, № 7. — P. 1820–1822.

5. Polymerase chain reaction amplification and typing of Rotavirus nucleic acid from stool specimens / V. Gouvea [e al.] // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 30, № 2. — P. 276–282.

6. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses / M. Rahman [et al.] // J. Virol. — 2007. — Vol. 81, № 5. — P. 2382–2390.

7. A candidate for a new serotype of human rotavirus / S. Matsuno [et al.] // J. Virol. — 1985. — Vol. 54. — P. 623–624.

8. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs / K. Bányai [et al.] // Vaccine. — 2012. — Vol. 30, № 1. — P. A122–A130.

9. Molecular characteristics of German G8P[4] rotavirus strain GER1H-09 suggest that a genotyping and subclassification update is required for G8 / C. Pietsch [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2009. — Vol. 47, № 11. — P. 3569–3576.

10. Identification of G8 rotavirus strains determinded as G12 by rotavirus genotyping PCR: Updating the current genotyping methods / F. Aladin [et al.] // J. Clin. Virol. — 2010. — Vol. 47. – P. 340–344.

## ROTAVIRUS GENOTYPING USING MULTIPLEX PCR: OPPORTUNITIES, CHALLENGES, SOLUTIONS

**Semeiko G.V., Yermolovich M.A., Svircheuskaya E.Yu., Matus O.V., Samoilovich E.O.**

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

The most common method of rotavirus genotyping is semi-nested multiplex RT-PCR, widely described in the literature; it allows to define genotype in a large proportion of samples. But at the same time, this method can be used to identify mainly common genotypes (G1-4, G9 and P [4], P [6], P [8], P [9]). To determine genotype of non-typeable in semi-nested multiplex RT-PCR strains, confirm the results of RT-PCR if the genotype is new for the country or region, or a combination of P- and G-type is unusual, to observe variability of rotaviruses and assess the efficiency of primers it is necessary to perform sequencing of VP4 and VP7 genes.

**Keywords:** rotavirus, genotypes, multiplex PCR, sequencing, primers.

Поступила 02.09.2013

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БОКАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Сивец Н.В., Грибкова Н.В.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В данной работе показаны эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции в Республике Беларусь, выявлена частота встречаемости бокавируса, его вклад в этиологическую структуру ОРВИ. Самая высокая частота выявления HBoV за анализируемый период наблюдалась в Гомельской (18,6%) и Брестской (15,8%) областях. Среди детей, госпитализированных в стационар по поводу ОРВИ, заболевания бокавирусной этиологии составили 11,6%. Из них у 67% обследованных детей лабораторно подтверждена HBoV моноинфекция и в 33% случаев инфекция протекала в сочетании с ОРВИ другой этиологии. Наиболее часто ко-инфекция отмечалась с рино- (57,8%) и РС-вирусами (32,4%).

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

**Введение.** В структуре общей инфекционной заболеваемости человека острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают лидирующую позицию и являются серьезной проблемой здравоохранения не только из-за частоты и тяжести, но и вследствие наносимого ими экономического ущерба, как отдельным лицам, так и обществу в целом. Этиология ОРВИ достаточно разнообразна. Возбудителями ОРВИ могут быть респираторные вирусы, энтеровирусы, коронавирусы, многочисленные бактерии, а также, так называемые атипичные микроорганизмы — хламидии, микоплазмы, пневмоцисты, грибы. Наиболее восприимчивым к данным возбудителям является детское население возрастной категории от 0 до 7 лет. Это связано с незрелостью детской иммунной системы и с началом периода активной социализации. Следует отметить, что ОРВИ у детей, особенно раннего возраста, кроме более высокой частоты заболеваемости, нередко характеризуются тяжелым течением и в ряде случаев протекают с серьезными осложнениями, требующими госпитализации в стационар. В последние годы прослеживается значительное повышение заболеваемости детей ОРВИ и гриппом.

С активным развитием методов молекулярной диагностики практически ежегодно происходит открытие новых респираторных вирусов. В 2005 г. в Швеции был описан новый респираторный вирус — бокавирус человека (HBoV), обнаруженный в носоглоточных образцах от детей, госпитализированных с острыми респираторными инфекциями верхних и нижних дыхательных путей [1]. Последующие исследования показали циркуляцию бокавируса во всех странах мира [2]. HBov преимущественно выявляется у детей раннего возраста. Наиболее частыми клиническими симптомами, регистрируемыми у пациентов с HBoV-инфекцией, являются кашель, ринорея, лихорадка, затрудненное дыхание. Вместе с тем, особенно у детей младшего возраста, для бокавирусной инфекции

наиболее характерно поражение нижних отделов дыхательных путей с развитием симптомов трахеита, бронхита и пневмонии. [3].

Ранее в наших исследованиях была показана циркуляция бокавируса человека на территории РБ, однако, учитывая короткий период наблюдений, определить эпидемиологические особенности и вклад HBoV в этиологическую структуру ОРВИ не представлялось возможным. Поэтому **целью** данной работы явился анализ эпидемиологических особенностей циркуляции бокавируса человека на территории Республики Беларусь в эпидемические сезоны по гриппу 2010–2013 гг.

**Маиериалы и методы.** Материалом для исследования служили носоглоточные мазки, полученные на протяжении трех эпидемических сезонов по гриппу с октября 2010 г. по сентябрь 2013 гг.

Носоглоточные мазки были собраны в стерильные пробирки, содержащие 2 мл транспортной среды следующего состава: раствор Хенкса, 0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА), 4% раствор гентамицина сульфата (250 мг/л), нистатин (0,5х106 МЕ/л). Полученный материал исследовали методом полимеразой цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени. Исследования проводили с использованием диагностических наборов «АмплиСенс», Москва, Россия. Амплификацию и анализ результатов исследований проводили на приборе Rotor Gene 6000, Corbett research, Австралия. Данные представлены в виде абсолютных чисел и процентном соотношении к общему числу проанализированных образцов.

**Результаты и их обсуждение.** За данный период исследовано 1511 клинических образцов от госпитализированных в стационары детей в возрасте от 0 до 18 лет из всех регионов страны, в т. ч. 461 — 2010–2011 гг, 507 — 2011–2012 гг, 543 — 2012–2013 гг. Генетический материал респираторных вирусов обнаружен в 998 (66%) образцах. ДНК бокавируса выявлена в 116 клинических образцах (11,6%). Следует отметить, что частота выявления HBoV в разные сезоны значительно варьировала. В сезон 2010–2011 гг. частота выявления генетического материала HBoV составила 8,7%, за 2011–2012 гг. — 20% и 2012–2013 гг. — 6,7%. По полученным данным видно, что максимальная частота выявления бокавируса соответствовала сезону 2011–2012 гг. Отмечено протекание HBoV-инфекции как в виде моноинфекции, так и в сочетании с другими респираторными вирусами. Из всех лабораторно подтвержденных случаев у 67% пациентов заболевание протекало в виде моноинфекции, ко-инфицирование наблюдалось у 33% пациентов. Наиболее часто ко-инфекция отмечалась с риновирусами (57,8%), респираторно-синцитиальным вирусом (РС) (32,4%) и аденовирусами (АД) (23,6%). Что касается других не гриппозных респираторных вирусов, то в эпидемический сезон 2010–2011 гг. лидирующее место в этиологической структуре ОРВИ занимали вирусы парагриппа (ПГ) (24,4%). На втором месте по частоте обнаружения были риновирусы (23,2%). Третьим по значимости этиологическим агентом стал аденовирус (10,4%) (рисунок 1).

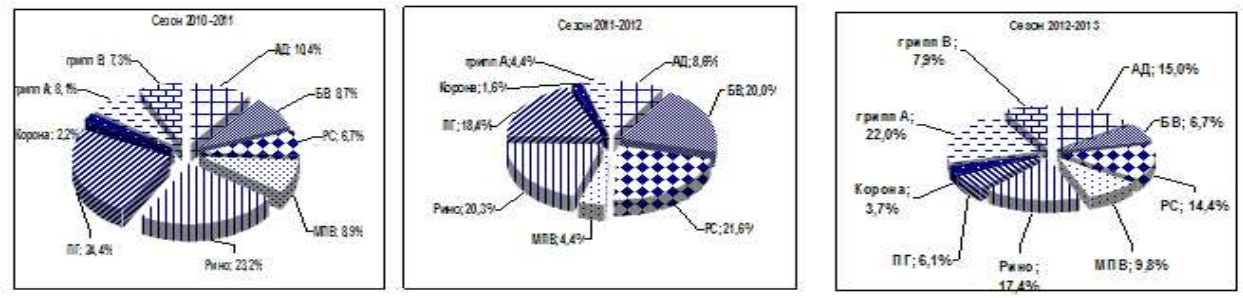



Рисунок 1 — Этиологическая структура ОРВИ за три эпидемических сезона

В эпидемический сезон 2011–2012 гг. в этиологической структуре ОРВИ доминировали РС (21,6%) и риновирусы (20,3%). Вклад вирусов парагриппа и аденовирусов в этиологическую структуру ОРВИ в этот период уменьшился. В сезон 2012–2013 гг. происходит увеличение циркуляции аденовирусов (15%) и незначительный спад циркуляции РС-вируса (14,4%) и риновирусов (17,4%).

Обычно в период с января по март в Республике Беларусь регистрируется эпидемия гриппа, и преимущественно доминируют вирусы гриппа. В этот период происходит снижение циркуляция других респираторных вирусов [4]. На протяжении трех лет наблюдений показана активная циркуляция бокавируса в осенний период с максимальной частотой выявления HBoV в ноябре 2011–

2012 гг. В мазках, забранных в период с января по май, а также в летний период, генетический материал бокавируса выявлялся в виде спорадических случаев. В других странах пик активной циркуляции HBoV показан для летнего периода. Сезонная циркуляция бокавируса за три эпидемических по гриппу сезонов представлена на рисунке 2.

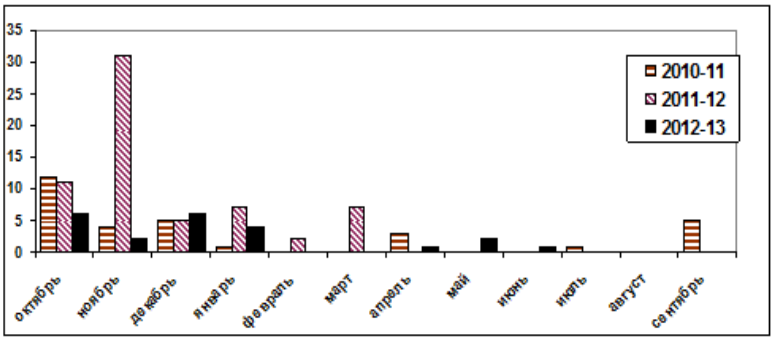



Рисунок 2 — Сезонная циркуляция бокавируса за 2010–2013 гг.

Анализ возрастной структуры детей с HBoV-инфекцией показал, что ДНК бокавируса наиболее часто выявлялась у детей возрастной категории от 0 до 4 лет (98,2%), в назофарингеальных мазках, полученных от детей возрастной группы 5–14 лет, — в виде спорадических случаев.

За анализируемый период бокавирус был выявлен на всех административных регионах страны. Частота выявления на территории РБ характеризовалась неравномерным территориальным распределением (рисунок 3). Самая высокая частота выявления HBoV за анализируемый период выявлена в Гродненской и Брестской областях, что составило 18,6 и 15,8% соответственно, самый низкий показатель был зафиксирован в г. Минске (9,7%), Минской(10,6%) и Могилевской(10,7%) областях.

Рисунок 3 — Территориальное распределение выявления бокавируса за 2010–2013 гг.

**Выводы.** В результате проведенного исследования нами подтверждены полученные ранее данные о циркуляции бокавируса и показано выявление данного возбудителя на всех административных регионах страны в течение трех эпидемических сезонов. Самая высокая частота выявления HBoV за анализируемый период выявлена в Гродненской (18,6%) и Брестской (15,8%) областях.

Среди госпитализированных детей ДНК бокавируса выявлена в 11,6% образцах клинического материала. Максимальная частота выявления генетического материала HBoV за анализируемый период отмечена в ноябре 2011–2012 гг. и составила 20%. HBoV-инфекция протекала в виде моноинфекции в 67% случаев, в 33% случаев инфекция выявлялась в сочетании с ОРВИ другой этиологии. Наиболее часто ко-инфекция отмечалась с рино- (57,8%) и РС-вирусами (32,4%).

За данный период наблюдений показана активная циркуляция бокавируса в осенний период и в виде спорадических случае в весеннее, зимнее и летнее время.

Сравнительный анализ выявления HboV среди детей различных возрастных категорий показал, что наиболее часто вирус выявлялся у детей возрастной группы 0–4 лет, в то время как у детей старше 5 лет отмечено спорадическое инфицирование HboV.

Внедрение молекулярно-генетических методов диагностики (ПЦР) в повседневную рутинную практику позволит расширить представления об эпидемиологии бокавирусной инфекции, будет способствовать определению ее удельного веса в этиологической структуре ОРВИ, а также расширит знания о патогенезе связанной с ним инфекции.

**Литература**

1. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / T. Allander [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102. — P. 12891–12896.

2. Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections? / O. Schildgen [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 21, № 2. — P. 291–304.

3. American Academy of Pediatrics. 2006. Diagnosis and management of bronchiolitis // Pediatrics. — 2006. — Vol. 118. — P. 1774–1793.

4. Особенности эпидемиологического сезона по гриппу 2011–2012 гг. в Беларуси / Н.В. Грибкова [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 11.

## EPIDEMIOLOGICAL FSPECTSOF HUMAN BOCAVIRUS INFECTION IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**Sivets N.V., Gribkova N.V.**

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

We investigated the epidemiological features for human bocavirus in the Republic of Belarus, revealed frequency of occurrence of human bocavirus and defined its contribution to the etiological structure of acute respiratory tract illness (ARTI). The highest incidence of HBoV was observed in Brest (15.8%) and Gomel (18.6%) regions for the analyzed period. Of these, 67% of children had mono-infection and in 33% of cases the infection is combined with other respiratory viruses. The most common co-infection was observed with rhino- (57.8%) and PC viruses (32.4%).

**Keywords:** human Bocavirus, revealed frequency, acute respiratory infection.

Поступила 06.09.2013

## ГЕНОМНЫЕ ПРЕДПОСЫЛКИ КОНКУРЕНТНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГИПЕРИНВАЗИВНЫХ ЛИНИЙ *NEISSERIA MENINGITIDIS*

**Синюк К.В., Титов Л.П.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Проведено исследование влияние аллельных профилей генов «домашнего хозяйства» на патогенность и потенциал к распространению изолятов, несущих данные аллели. На основании анализа динамики доминирующих на территории Европы клональных комплексов *N. meningitidis* была выявлена роль центральных сиквенс-типов в распространении соответствующих клональных комплексов, определены ее геномные предпосылки. Изученные клональные комплексы были распределены по 3 группам, характеризующим их генетическую структуру и потенциал к распространению в популяции человека. Полученные данные позволяют более точно прогнозировать заболеваемость менингококковой инфекции на основании текущего эпидемиологического надзора.

**Ключевые слова:** мультилокусное сиквенс-типирование, менингококковая инфекция, рекомбинация, патогенность изолята.

Применение метода мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) в качестве «золотого стандарта» эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией [1, 2] позволило накопить большой массив данных, доступный для исследователей через Интернет [3]. МЛСТ изолятов N. meningitidis основано на расшифровке нуклеотидной последовательности 7 генов домашнего хозяйства [2]. Каждой новой последовательности (аллели гена) присваивается новый номер. Совокупность номеров аллелей 7 генов определяют сиквенс-тип (ST) изолята. Сиквенс-типы с различием по

1–2 генам объединяются в группы на основании их схожести с центральным сиквенс-типом — клональные комплексы — с помощью BURST алгоритма [4, 5].

Изучение коллекции изолятов, выделенных от пациентов и носителей начиная с 1970 г. в Чехии [6] позволило установить различия в частоте встречаемости сиквенс-типов [7]. Математическое моделирование процессов рекомбинации показало, что существуют определенные сиквенс-типы, которые обладают сравнительно большим потенциалом к передаче от человека к человеку по сравнению с другими аллельными профилями [8]. При этом патогенность изолята не влияет на его способность к распространению и ее сохранение возможно в персистирующих линиях возбудителя, то есть сиквенс-типах, обладающих более высокой по сравнению с другими, способностью к распространению в популяции человека.

Проведенные нами ранее исследования показали наличие нескольких филогенетических линий *N. meningitidis*, сохраняющихся на протяжении времени [9, 10], что коррелирует с данными о повышенной способности к распространению изолятов с определенными аллельными профилями.

**Целью** нашего исследования является определение возможности использования типируемых участков генов в качестве маркера патогенности изолята и оценка динамики его распространения для эпидемиологического прогнозирования.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования были выбраны 10 клональных комплексов, наиболее распространенных на территории Европы, включая изолятытипированные в лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии [11, 12] (таблица). СТ данных комплексов были экспортированы из базы данных PubMLST, с учетом об источнике изолятов (пациент, носитель), времени и территории выделения.

Таблица — Основные клональные комплексы, доминирующие на территории Европы

| Название клонального комплекса | Число изолятов комплекса | Число изолятов с центральным СТ |
|---|---|---|
| СТ-41/44 комплекс/Линия 3 | 3009 | 349 |
| СТ-11 комплекс/ЕТ-37 комплекс | 1687 | 1231 |
| СТ-32 комплекс/ЕТ-5 комплекс | 1589 | 663 |
| СТ-269 комплекс | 903 | 139 |
| СТ-23 комплекс/Кластер А3 | 712 | 365 |
| СТ-5 комплекс/субгруппа III | 697 | 110 |
| СТ-22 комплекс | 518 | 91 |
| СТ-35 комплекс | 497 | 133 |
| СТ-213 комплекс | 455 | 122 |
| СТ-8 комплекс/Кластер А4 | 419 | 221 |

Данные обрабатывались методами описательной статистики, корреляции оценивались по критерию Пирсона с оценкой достоверности по критерию Стьюдента. Группировка сиквенс-типов возбудителя проводилась BURST алгоритмом [5].

**Результаты и их обсуждение.** Наличие прямой корреляционной связи умеренной силы ($r=0,49\pm0,17$) между общим количеством изолятов, принадлежащих к одному клональному комплексу и числом изолятов с сиквенс-типом, центральным для данного комплекса, подтверждает гипотезу, что по мере увеличения доли конкурентного сиквенс-типа идет одновременное формирование дочерних сиквенс-типов путем рекомбинации. При этом дочерние сиквенс-типы обладают меньшей способностью к передаче по сравнению с центральным, который вытесняет их из циркуляции.

Для оценки конкурентного взаимодействия сиквенс-типов внутри одного клонального комплекса был проведен BURST анализ с группировкой по 5 локусам. Изучаемые комплексы по результатам анализа можно поделить на 3 группы, различающиеся по содержанию дочерних сиквенс-типов и их кластеризации. Для клональных комплексов СТ-41/44, СТ-269, СТ-5 и СТ-22 характерно наличие 6–9 подгрупп с большим количеством сиквенс-типов, отличающихся от центральных для подгрупп аллельных профилей по одному или двумя локусам (рисунок 1).

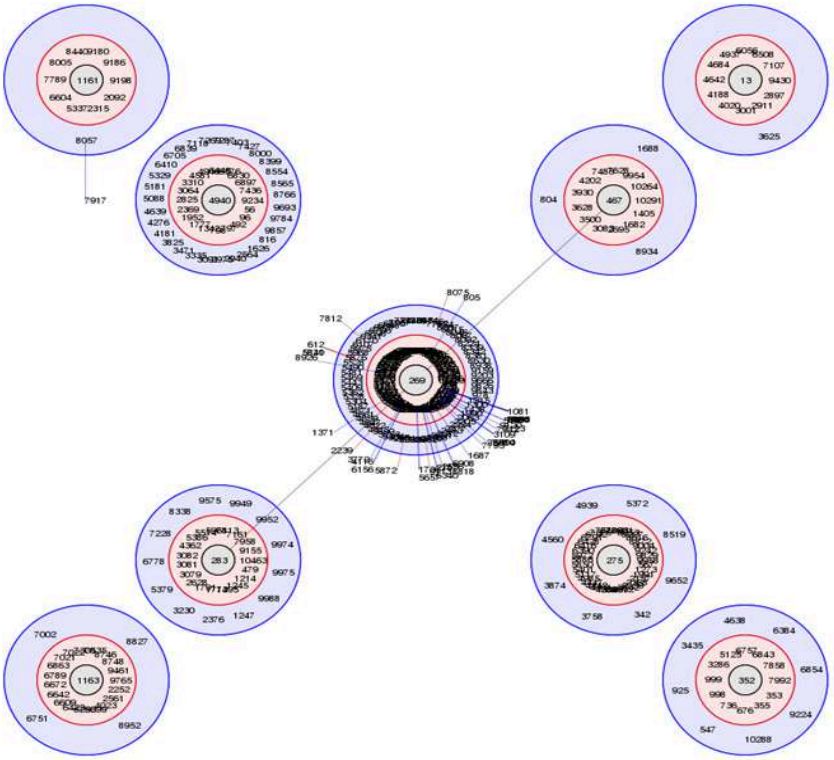


Рисунок 1 — Группировка сиквенс-типов СТ-269 клонального комплекса алгоритмом BURST

Клональные комплексы СТ-11, СТ-32, СТ-23 и СТ-8 характеризуются меньшим количеством подгрупп с малым количеством сиквенс-типов внутри данных подгрупп. Клональные комплексы СТ-35 и СТ-213 занимают промежуточное положение между вышеописанными группами. Существует прямая взаимосвязь между описанными структурами внутри клональных комплексов и соотношением числа всех изолятов комплекса к изолятам, формируемым на основе центрального сиквенс-типа. Чем больше такое соотношение, тем больше сиквенс-типов распределено по подгруппам, а не группируются вокруг центрального сиквенс-типа.

Полученные данные указывают на различия в потенциале к распространению в популяции хозяина для дочерних сиквенс-типов, принадлежащих к различным клональным комплексам. Наличие большего числа подгрупп и сиквенс-типов в данных подгруппах вСТ-41/44, СТ-269, СТ-5 и СТ-22 комплексах по сравнению с другими изученными комплексами указывают на то, что отдельные дочерние сиквенс-типы данных комплексов могут быстро распространяться в популяции хозяина и проявлять свойства гиперинвазивных изолятов.

Так, при анализе изучении частоты встречаемости центрального и других сиквенс-типов изученных клональных комплексов было установлено, что динамика распространения комплекса обусловлена динамикой его центрального сиквенс-типа (рисунок 2). При этом изменения динамики центрального сиквенс-типа опережают изменения встречаемости изолятов данного комплекса, что имеет большое значение для эпидемиологического прогнозирования. Данная корреляция наиболее выражена в клональных комплексах с малым числом подгрупп (для СТ-11 комплекса r=0,98±0,04) и менее характерна для комплексов с разветвленной структурой подгрупп (r=0,75±0,11 для СТ-41/44 комплекса).

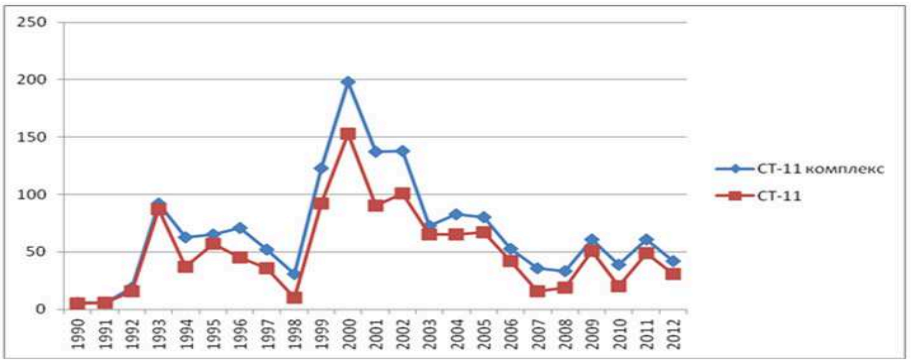



Рисунок 2 — Динамика частоты встречаемости изолятов *N. meningitidis*, принадлежащих к CT-11 комплексу и сиквенс-типу CT-11

**Выводы.** Результаты настоящего исследования свидетельствуют о более высоком потенциале к трансмиссии в популяции человека (передаче), характерном для изолятов, относящихся к с центральным и сиквенс-типами клональных комплексов. Так, например, CT-213 комплекс состоит из центрального CT-213 (26,8% изолятов) и 281 сиквенс-типов (73,2%). Потенциал к распространению изолятов с дочерними сиквенс-типами в некоторых клональных комплексах неоднороден, но, как правило, ниже, чем у изолятов с центральным сиквенс-типом. Появление на территории ранее не регистрировавшегося изолятас центральным CT можно рассматривать как прогностический маркер эпидемиологического неблагополучия и повышенного риска резкого увеличения трансмиссивностиизолятов данного клонального комплекса в популяции региона в последующий период времени

**Литература**

1. Титов, Л.П. Менингококковая инфекция: современное состояние проблемы / Л.П. Титов //Здравоохранение. — 2010. — Т. 12. — С. 15–23.

2. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M.C.J. Maiden [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 1998. — Vol. 95, № 6. — P. 3140–3145.

3. Jolley, K.A. mlstdbNet–distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases / K.A. Jolley, M.S. Chan, M. Maiden // BMC bioinformatics. — 2004. — Vol. 5, № 1. — P. 86.

4. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species–the eBURST approach / B.G. Spratt [et al.] // FEMS microbiology letters. — 2004. — Vol. 241, № 2. — P. 129–134.

5. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data / E.J. Feil [et al.] // J. Bacteriol. — 2004. — Vol. 186, № 5. —

P. 1518–1530.

6. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway / S.P. Yazdankhah [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42, № 11. — P. 5146–5153.

7. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining populatio / K.A. Jolley [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38, № 12. — P. 4492–4498.

8. Role of selection in the emergence of lineages and the evolution of virulence in *Neisseria meningitidis* / C.O. Buckee [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 2008. — Vol. 105, № 39. — P. 15082–15087.

9. Molecular epidemiology of Neisseria meningitidis in the Republic of Belarus in comparison to pathogen populations from other European countries / L.P. Titov [et al.] // 6th Intern. Conf. of Bioinformatics and Biomedical Engineering, Shanghai, China May 17–20th, 2012 / iCBBE. — Shanghai, 2012.

10. Evolutionary epidemiology of Neisseria meningitidis strains isolated in Belarus compared to those from Europe / L.P. Titov [et al.] // Acta Immunol. Microbiol. — [Accepted for publication, 2012.]

11. Аллельное разнообразие и филогения генов домашнего хозяйства изолятов

N. MENINGITIDIS, циркулирующих на территории Республики Беларусь / С.Э. Глазкова [и др.] // Весці Нац. акад. Беларусі. Сер. мед. навук. — 2011. — № 3. — С. 99–105.

12. Глазкова, С.Э. Молекулярно-генетический анализ хаускипинг генов adk и aroE штаммов в *neisseria meningitidis*, выделенных от больных менингитом / С.Э. Глазкова, Е.С. Носова, Л.П. Титов // Мед. журн. — 2007. — № 4. — С. 47–50.

## GENOMIC PRECONDITIONS OF HYPERINVASIVE *N. MENINGITIDIS* LINEAGES COMPETITIVE DISSEMINATION

**Siniuk K.V., Titov L.P.**
*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus*

We investigated influence of housekeeping genes allelic profiles on pathogenicity and dissemination potential of isolates carrying these alleles. Role of central sequence-types were elucidated by analysis of predominated on territory of Europe *N. meningitidis* clonal complexes. Studied complexes were divided into 3 groups based on their genetic structure and potential to disseminate in human population. These findings facilitate accurate forecast of meningococcal infection morbidity on basis of current epidemiological surveillance.

**Keywords:** multilocus sequence-typing, meningococcal infection, recombination, the pathogenicity of isolates/

Поступила 04.09.2013

## ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА В КРОВОСОСУЩИХ КОМАРАХ И МОШКАХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2011–2012 ГГ.

**Соглаева А.А., Самойлова Т.И., Климович О.В., Залевскоя О.С., Азарова И.А.**
*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь.*

**Резюме.** В статье представлены результаты выявления антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах и мошках, собранных на территории всех областей Республики Беларусь за период 2011–2012 гг.

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

**Введение.** Одной из наиболее значимых арбовирусных инфекций в эпидемиологическом отношении для РБ является вирусный Западно-Нильский энцефалит (ВЗНЭ), возбудителем которого является вирус Западного Нила (ЗН). Вирус ЗН относится к роду *Flavivirus*, семейства *Flaviviridae* и принадлежит к антигенному комплексу японского энцефалита [1]. Впервые этот возбудитель был выделен в Африке (Уганда) K. Smithburn и соавт. в 1937 г. из крови лихорадящей больной при массовом обследовании населения на носительство вируса желтой лихорадки и по месту его обнаружения получил одноименное название «Западный Нил» [2]. Природные очаги Западно-Нильской инфекции зарегистрированы практически повсеместно в Африке, а также в странах европейского Средиземноморья, Ближнего Востока, Средней Азии, на Кавказе, Индийском субконтиненте, в Индонезии, Малайзии, Таиланде и других тропических государств. На Американском континенте вирус ЗН был впервые выявлен в 1999 г [3]. В Европе вирус ЗН был выделен в 60-х гг. (Франция, Россия) от людей, комаров и клещей, хотя наличие антител к вирусу было обнаружено в крови жителей Албании еще в конце 50-х гг. [4]. В настоящее время различными исследователями выделяются изоляты вируса ЗН во многих странах мира [4–7]. В последние годы вирус ЗН становится все более агрессивным и вызывает заболевания и эпидемические вспышки даже в тех регионах, в которых он не был ранее известен [3, 8, 9]. На территории Беларуси вирус впервые был выделен и идентифицирован в 1985 г. от птиц (штамм 48-ЗН Тремля). Позже вирус был изолирован от кровососущих комаров рода *Aedes* (штаммы 319 и 2438) и из крови лихорадящего больного (штамм Вин.), проживающего на территории Беловежской пущи [10].

**Цель:** выявление антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах и мошках, собранных на территории Республики Беларусь за 2011–2012 гг.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили кровососущие комары и мошки, собранные во всех областях республики за 2011–2012 гг.: Брестская (60 биопроб), Витебская (49 биопроб), Гомельская (75 биопробы), Гродненская (57 биопроб), Минская (49 биопроб) и Могилевская (51 биопроб). Кровососущие комары в наших исследованиях были представлены 3 родами: *Aedes* (39,6%), *Anopheles* (34,2%) и *Culex* (26,2%), мошки — сем. *Simulidae*. Выявление антигена вируса ЗН в полевом материале проводили методом ИФА. Перед постановкой ИФА проводили подготовку биопроб: биопробы кровососущих комаров и мошек отмывали эфиром, 70% спиртом, а

затем трехкратно физиологическим раствором с добавлением антибиотиков. Для приготовления суспензии членистоногих тщательно растирали и к гомогенатам добавляли физиологический раствор из расчета 2–3 мл на одну биопробу. Осветленную надосадочную жидкость (после центрифугирования или отстаивания в течение нескольких часов при температуре +4°С) использовали в ИФА. ИФА проводили с использованием «Тест-системы иммуноферментной для индикации антигена вируса Западного Нила» производства Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (г. Москва), согласно инструкции производителя.

**Результаты и их обсуждения.** Проведенное исследование в ИФА биопроб кровососущих комаров показало, что антиген вируса ЗН выявлялся на территории всех областей республики (таблица).

Таблица — Выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах и мошках по областям за 2011–2012 гг.

| Области | Кровососущие комары | | Мошки | |
|---|---|---|---|---|
| | биопробы | % положительных | биопробы | % положительных |
| Витебская | 49/5*) | 10,2 | – | – |
| Могилевская | 50/7 | 14,0 | 1/0 | – |
| Гродненская | 47/6 | 12,8 | 10/0 | – |
| Минская | 49/6 | 12,2 | – | - |
| Брестская | 45/7 | 15,6 | 15/2 | 13,3 |
| Гомельская | 58/11 | 18,9 | 17/2 | 11,8 |
| ИТОГО | 298/42 | 14,1 | 43/4 | 9,3 |

Примечаниея. *) — в числителе — количество исследованных биопроб, в знаменателе — количество положительных биопроб.

Как видно из таблицы наиболее высокий процент выявления антигена за 2 года отмечен в Гомельской области (18,9), а наиболее низкий — в Витебской (10,2). В Брестской области антиген вируса ЗН выявлялся в 15,6% биопроб, в Могилевской — в 14%, а в Минской и Гродненской областях процент положительных биопроб составил 12,2 и 12,8% соответственно. Зараженность кровососущих комаров вирусом ЗН в целом по РБ за 2 года составила 14,1%. Антиген вируса ЗН выявлялся также в биопробах мошек, собранных на территории Брестской (13,3%) и Гомельской (11,8%) областей. Следует отметить, что выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах в 2012 г. возросло по сравнению с 2011 г. как по РБ в целом, так и отдельно по областям (рисунок 1).

Как видно из рисунка процент выявления положительных биопроб в 2012 г. был выше, чем в 2011 г. во всех областях республике. Наибольшая динамика роста выявления антигена отмечена в Гомельской области: с 16,7% в 2011 г. до 25,0% в 2012 г., а наименьшая — в Гродненской: с 12,5% в 2011 г. до 13,3% в 2012 г. Выявление антигена вируса ЗН в кровососущих комарах на территории всей республики увеличилось с 12,8% в 2011 г. до 16,7% в 2012 г.

Если рассматривать обнаружение антигена вируса ЗН по родам комаров, то наибольший процент содержания антигена вируса отмечен у комаров р. *Anopheles* — 19,6% (20 положительных био-

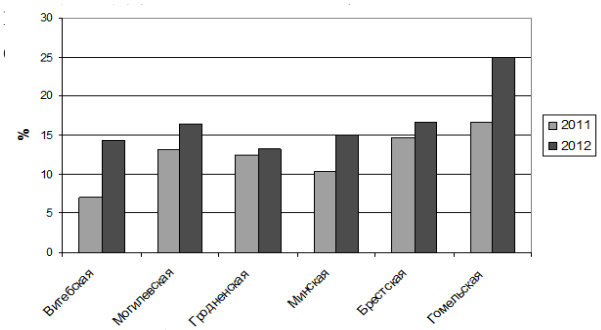



Рисунок 1 — Выявление антигена вируса Западного Нила в кровососущих комарах по областям Республики Беларусь по годам

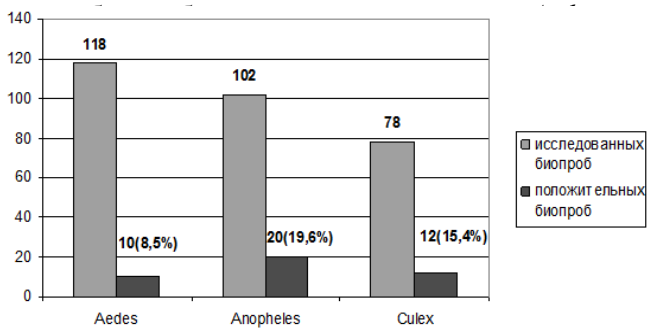



Рисунок 2 — Выявление антигена вируса Западного Нила в биопробах кровососущих комаров по родам (2011–2012 гг.)

Таким образом, проведенные исследования кровососущих комаров и мошек показали, что вирус Западного Нила циркулирует на территории всех областей Республики Беларусь. Кроме того, отмечается рост выявления зараженности кровососущих комаров, собранных в 2012 г. по сравнению с зараженностью переносчиков, собранных в 2011 г. Также следует отметить, что антиген вируса Западного Нила обнаруживается в кровососущих комарах всех трех исследуемых родов (*Aedes*, *Anopheles* и *Culex*) и мошках. Учитывая, что синантропные и полусинантропные роды комаров *Anopheles* и *Culex* обитают поблизости с жильем человека и постоянно соприкасаются с ним, инфицированные вирусом ЗН переносчики создают угрозу заражения людей этим возбудителем.

**Литература**


1. Венгеров, Ю.Я. Лихорадка Западного Нила / Ю.Я. Венгеров, А.Е. Платонов // Лечащий врач. — 2000. — № 10. — С. 56–60.
2. Львов, Д.К. Лихорадка Западного Нила / Д.К. Львов // Вопр. вирусол. — 2000. — № 2. — С. 4–9.
3. Nosal, B. West Nile virus / B. Nosal, R. Pellizzari // Can. Med. Assoc. J. — 2003. — Vol. 168, № 11. — P. 1443–1444.
4. Hubalek, Z. West Nile fever — a reemerging mosquito-born viral disease in Europe / Z. Hubalek, J. Halouzka // Emerg. Infect. Dis. — 1999. — № 5. — P. 643–650.
5. Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in Southern Russia, 1999 / D.K. Lvov [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2000. — № 6. — P. 373–376.
6. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses / J.S. Mackenzie [et al.] // Nature Med. — 2004. — Vol. 10, № 12. — P. 98–109.
7. Zeller, H.G. West Nile virus: an overiew of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas / H.G. Zeller, I. Schuffenecker // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 23, № 3. — P. 147–156.
8. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000 / M.Y. Chowers [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2001. — № 7. — P 675–678.
9. Environmental Drivers of West Nile Fever Epidemiology in Europe and Western Asia / S Paz [et al.] // Int. J. Envir. Res. Pub. Health. — 2013. — Vol. 10. — P. 3543–3562.
10. 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.


## WEST NILE VIRUS ANTIGEN DETECTION IN MOSQUITOES AND MIDGES IN BELARUS IN 2011-2012


**Soglaeva A.A., Samoilova T.I., Klimovich O.V., Zalevskaya O.S., Azarova I.A.**

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



The results obtained in the study of the West Nile virus antigen detection in blood-sucking mosquitoes and biting midges in Belarus in 2011-2012 are presented in the paper.



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

Поступила 04.09.2013


## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ГЕНОМА УНИКАЛЬНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННОЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ


**Сосинович С.В.[1], Еремин В.Ф.[1], Гасич Е.Л.[1], Томсон М.[2]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;*

*[2]Институт здоровья им. Карлоса III, Махадаонда (Мадрид), Испания*



**Резюме.** Выполненное полноразмерное секвенирование генома ВИЧ-1 пациентки Mos позволило определить новую уникальную рекомбинантную форму и дать его молекулярную характеристику. Показано, что геном данного изолята содержит фрагменты генетического материала ВИЧ субтипов А и В.



**Ключевые слова:** ВИЧ, субтипы ВИЧ, рекомбинантные формы, ПЦР, бутскан анализ.


**Введение.** ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, вызывающий ВИЧ-инфекцию, конечной стадией которой является СПИД. По состоянию на 2011 г. в мире проживает 34 миллиона ВИЧ-

инфицированных и больных СПИД [1]. Вирус обладает большим количеством генетических форм, обусловленных высокой степенью мутаций, рекомбинаций и репликации. Все выявленные формы ВИЧ разделяются на 3 группы: M, N и O. В эпидемии ВИЧ/СПИД основную роль играют вирусы группы M ВИЧ-1, состоящие из одиннадцати субтипов (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, и K), циркулирующих рекомбинантных форм (ЦРФ) и уникальных рекомбинантных форм (УРФ). На сегодняшний день описано 55 ЦРФ ВИЧ-1 [2].

В Беларуси по состоянию на 01.05.2013 г. проживает около 11,5 тыс. ВИЧ-позитивных пациентов [3]. Исследования по генотипированию ВИЧ-1 по гену pol показали, что на территории Беларуси среди пациентов с ВИЧ/СПИДом по-прежнему доминирует субтип A (89,9%), на субтип B приходится 2,9%, C и G — по 0,7%, на рекомбинантные формы вируса — 5,8%, доля которых увеличивается [4]. В ходе молекулярно-эпидемиологического мониторинга ВИЧ-инфекции в Беларуси в лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций был выявлен образец ВИЧ, названный Mos, который по генам gag, pol и env относился к различным субтипам ВИЧ-1. Как показали проведенные исследования, вирус по гену gag был отнесен к субтипу B, а по генам pol и env — к субтипу A ВИЧ-1 [5, 6]. Для выяснения полной структуры генома изолята Mos были установлены нуклеотидные последовательности полноразмерного генома данного вируса.

**Цель** исследования — дать молекулярную характеристику полноразмерного генома выявленной на территории Беларуси уникальной рекомбинантной формы ВИЧ.

**Материалы и методы.** Материалом для данного исследования являлась плазма крови ВИЧ-инфицированной пациентки Mos 2004 года рождения, рожденной ВИЧ-инфицированной матерью. Выделение РНК вируса и амплификация полноразмерного генома осуществлялась в лаборатории биологии и изменчивости ВИЧ (Институт здоровья им. Карлоса III, Мадрид, Испания).

Для определения субтипа вируса, наличия рекомбинаций и анализа структуры генома был применен бутскан анализ, используя online-утилиты REGA HIV-1 Subtyping Tool Ver. 2.0 [7], HIV Genotyping Tool, NCBI [8]. Утилита BLAST [9] использовалась для выяснения вирусов-предшественников.

Мутации резистентности к препаратам ингибирования протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1 определялись с использованием алгоритма HIVdb Program: Genotype Resistance Interpretation, Stanford HIV Drug Resistance Database. Генотипическая мутация резистентности определялось как наличие, по крайней мере, одной замены в аминокислотной последовательности, приводящей к резистентности.

**Результаты и их обсуждение.** После амплификации полноразмерного генома ВИЧ-1 Mos получена последовательность длиной 8964 пар нуклеотидов. Относительно рефренс-изолята ВИЧ HXB2 данная последовательность имеет положение 556→9487 и включает все гены вируса, а также часть длинных концевых повторов (рисунок 1).

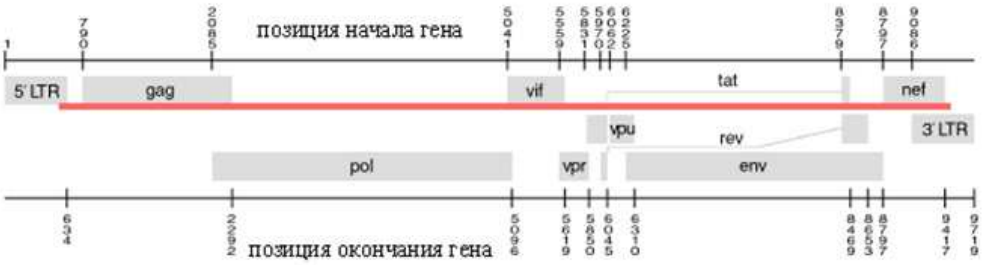



Рисунок 1 — Позиция полученных нуклеотидных последовательностей генома ВИЧ-1 Mos относительно рефренс изолята ВИЧ HXB2

Следующим этапом изучения выявленной формы ВИЧ стал бутскан анализа генома. Результат сканирования генома Mos с 9 субтипами ВИЧ (A1, B, C, D, F1, G, H, J, K) с использованием online-утилиты REGA HIV-1 Subtyping Tool показал, что данный образец относится к рекомбинанту AB (рисунок 2).

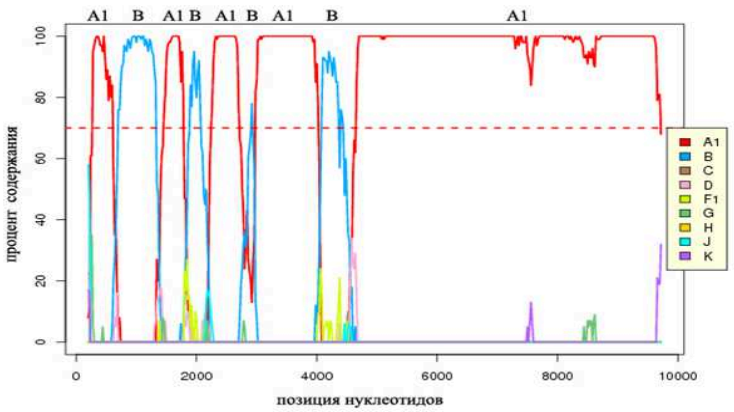



Рисунок 2 — Бутскан анализ ВИЧ-1 Mos с помощью online-утилиты REGA HIV-1 Subtyping Tool

Анализ субтипа ВИЧ-1 Mos альтернативной online-утилитой HIV Genotyping Tool, NCBI также подтвердил, что данный изолят является рекомбинантной формой вируса, геном которой состоит из фрагментов ВИЧ субтипов A и B (рисунок 3).

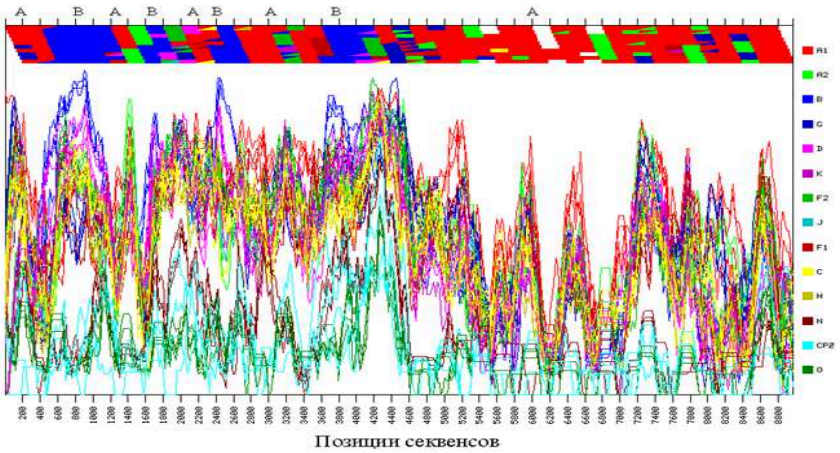



Рисунок 3 — Бутскан анализ ВИЧ-1 Mos с помощью online-утилиты HIV Genotyping Tool, NCBI

Установлена природа рекомбинантной формы. Проанализированы 2 наибольших фрагмента генома, относящихся к различным субтипам ВИЧ. Так, для поиска вируса субтипа B, использовался участок генома ВИЧ Mos длиной 709 пар нуклеотидов, позиция относительно HXB2 1058 → 1767. BLAST исследование показало, что данный фрагмент генома ВИЧ Mos наиболее близок к геному изолята ВИЧ-1 B 98GEMZ003, циркулирующим в Грузии. Процент совпадения геномов по данному участку составил 97%.

Для идентификации фрагмента генома Mos субтипа A был взят участок длиной 3972 пары нуклеотидов, позиция относительно HXB2 5565 → 9487. Результат BLAST анализа показал, что данный фрагмент наиболее близок к изоляту ВИЧ RU01029 , изолированному в Российской Федерации. Процент совпадения составил 93%.

Таким образом, установлено, что образец ВИЧ-1 Mos является новой рекомбинантной формой ВИЧ и включает в себя последовательности субтипов A (доминирущие) и B (минорные) Структура генома мозаична по генам gag и pol. Остальной геном вируса относится к субтипу A1 ВИЧ-1 (рисунок 4).

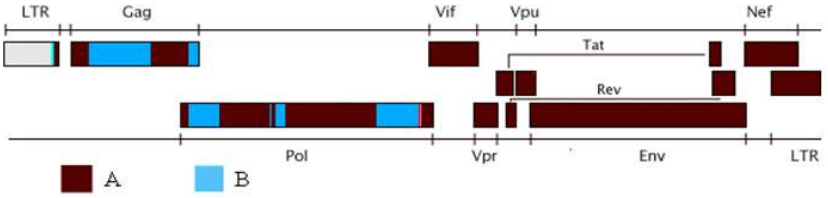



Рисунок 4 — Структура генома ВИЧ-1 Mos

Данный изолят является уникальной рекомбинантной формой вируса, поскольку аналогичная рекомбинантная форма до сих пор не была описана и не зарегистрирована ни в одной из доступных на сегодняшний день баз данных ВИЧ. Исследования по определению мутаций резистентности к препаратам высокоактивной антиретровирусной терапии показали, что данный образец вируса не имеет мутаций резистентности к ингибиторам протеазы, нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы. В настоящее время готовится документация на регистрацию данной уникальной формы вируса в международную базу данных GenBank.

**Выводы:**

1. На территории Беларуси от ВИЧ-инфицированного пациента выделен рекомбинантный изолят ВИЧ, относящийся к АВ рекомбинанту.

2. Проведенными исследованиями с использованием бутскан-анализа установлено, что выявленный образец является новой уникальной рекомбинантной форме ВИЧ-1, не имеющей аналогов в доступных средствах информации.

3. Фрагменты гена, относящиеся к субтипу А, наиболее вероятно, принадлежат ВИЧ-1 RU0102, циркулирующим в России, а фрагменты гена ВИЧ-1 субтипа В — изоляту из Грузии 98GEMZ003.

**Литература**

1. http://www.who.int/gho/hiv/en/.
2. http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html.
3. http://aids.by.
4. Молекулярная эпидемиология ВИЧ/СПИД в Беларуси (2008–2011) / В.Ф. Еремин [и др.] //Здравоохранение. — 2012. — № 1.
5. Еремин, В.Ф. Новая уникальная рекомбинантная форма ВИЧ-1, выявленная в Беларуси / В.Ф. Еремин, Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович // Вопр. вирусологии. — 2012. — Т. 57. — С. 9–13.
6. Eremin, V. A. New Unique Recombinant HIV Type 1 Isolated from a Child Born to an HIV-Infected Mother / V.F. Eremin, E.L. Gasich, S.V. Sasinovich // AIDS Research and Human Retroviruses. — 2011. — Vol. 27, № 12. — P. 1323–1326.
7. http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/.
8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi.
9. http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION NEAR FULL-LENGTH UNIQUE RECOMBINANT FORM HIV-1 MOS, REVEALED IN BELARUS

**Sasinovich S.V.[1], Eremin V.F.[1], Gasich E.L.[1], Thomson M.[2]**

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

*[2]Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain*

There is a new unique recombinant form (URF) of HIV-1, named Mos, is described. Amplified near full length genome and done molecular characterization of genome structure. As results show, this is a URF contained HIV A (dominated) and HIV B (minor) genome parts with mosaic structure.

**Keywords:** HIV, HIV subtypes, HIV recombinant forms, PCR, bootscanning analysis.

Поступила 04.09.2013

## ЗАРАЖЕННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ПОЛИДОМИНАНТНЫХ ОЧАГАХ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ

**Щучинова Л.Д.**

*Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай, Горно-Алтайск, Россия*

**Резюме.** Особенностью Республики Алтай является богатая фауна иксодовых клещей, которая обусловливает наличие полидоминантных очагов клещевого энцефалита, где переносчиками вируса выступают иксодовые клещи разных видов. Исследования показали, что зараженность иксодид вирусом клещевого энцефалита в таких очагах достоверно выше, чем в монодоминантных очагах

клещевого энцефалита. В трансмиссии возбудителя в Горном Алтае активно участвуют клещи рода *Dermacentor*, вирусофорность которых выше, чем вирусофорность основного переносчика *Ixodes persulcatus P.Schulze*.

**Ключевые слова:** клещевой энцефалит, вирусофорность, полидоминантные очаги.

**Введение.** Высокая численность и зараженность иксодид вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), видовое разнообразие переносчиков, близость природных биотопов к населенным пунктам и тесный контакт населения с клещами обусловливают напряженность очагов и высокую заболеваемость населения Республики Алтай, которая ежегодно входит в четверку самых неблагополучных территорий Российской Федерации по клещевому энцефалиту.

В Горном Алтае распространены 3 рода (8 видов) иксодовых клещей. Пять видов иксодид являются фоновыми: *Ixodes persulcatus P.Schulze*, *Dermacentor nuttalli Ol.*, *Dermacentor reticulatus Fabr.*, *Dermacentor silvarum Ol.*, *Haemaphisalis concinna Koch*.

Распределение их неоднородно и зависит от ландшафтов местности: в северной, таежной части (Турачакский район) Республики Алтай абсолютно доминирует традиционный переносчик — *I. persulcatus*, в высокогорной пустыне Кош-Агачского района в отсутствие таежных клещей основными переносчиками становятся клещи *D. nuttalli*. На остальной территории находятся полидоминантные очаги КЭ, где трансмиссия ВКЭ осуществляется иксодидами нескольких видов, отнесенных к 2–3 родам.

**Цель исследования:** изучение вирусофорности иксодид в полидоминантных очагах клещевого энцефалита.

**Материалы и методы.** Имаго иксодовых клещей собирали с растительности на флаг через каждые 10 км вдоль всех крупных автомобильных дорог (в том числе на всей протяженности Чуйского тракта — от северной до южной границы республики). Видовую принадлежность клещей определяли с помощью светового бинокулярного микроскопа МБС-10 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург) и определителя Н.А. Филипповой (1977, 1997).

Для оценки инфицированности клещей применялся иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием тест-системы «ВектоВКЭ-антиген» производства ЗАО «Вектор–Бест», г. Новосибирск в соответствии с инструкцией производителя. Измерение оптической плотности проводили на планшетном фотометре «Униплан» (производства «Пикон», Россия) при длине волны 450 нм. ИФА проведен для 4093 пробы: из них 2010 проб — из клещей, собранных с растительности, 2083 проб — из клещей, доставленных людьми, пострадавшими от присасывания клещей.

Анализ заболеваемости населения Республики Алтай клещевым энцефалитом (за 2001–2012 гг.) проводился по данным государственной статистической отчетности: Ф.№ 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», Ф.№ 60 «Журнал учета инфекционных больных», Ф.№ 003/У «Медицинская карта стационарного больного», Ф.№ 025/У «Медицинская карта амбулаторного больного», и по картам эпидемиологического обследования случаев клещевых инфекций. Частота контактов с клещами оценивалась по обращаемости людей в ЛПУ и формам первичной отчетно-учетной документации.

Данные о поголовье сельскохозяйственных животных взяты из отчетов Территориального органа федеральной службы государственный статистики по Республике Алтай.

Для графического оформления материала и статистической обработки применялись программы Microsoft: STATISTICA-6, системы электронных таблиц Microsoft Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Вирусофорность иксодовых клещей считается важным фактором риска заражения населения КЭ. Однако единого мнения в оценке этого параметра нет: по мнению одних ученых между динамикой заболеваемости и зараженности клещей ВКЭ есть корреляционная связь [1, 2], по мнению других исследователей, эта связь отсутствует [3, 4].

Замечено, что межгодовая вирусофорность подвержена колебаниям, причем ее рост отмечается в сезоны сниженной численности клещей [5]. Многими авторами описывается более высокая зараженность напившихся иксодид по сравнению с голодными особями, причины подобного явления исследователи объясняют активным размножением ВКЭ в организме питающихся переносчиков. В пользу этой теории говорит факт пропорционального роста вирусофорности иксодовых клещей с увеличением степени их «напитанности» [6].

Есть противоречивые сведения об увеличении вирусофорности клещей с возрастом [7] и, наоборот, о высокой вирусофорности «юных» имаго *I. persulcatus*, перелинявших из нимф без диапаузы [8].

Все вышеперечисленные исследования касались основного переносчика КЭ — таежных клещей, но в Республике Алтай кроме клещей *I. persulcatus* переносчиками ВКЭ выступают также клещи рода *Dermacentor* и (реже) клещи рода *Haemaphisalis*. Это обусловливает наличие полидоминантных очагов клещевого энцефалита на большей части территории республики.

В сезонах 2012–2013 гг. были уточнены сведения о видовом составе иксодовых клещей при исследовании 2800 экземпляров иксодид. Выяснилось, что доля *D. nuttalli* составила 44,2%, *I. persulcatus* — 28,8%, *D. silvarum* — 13,5%, *H. concinna* — 7,5%, *D.reticulatus* — 5,7%, *I. pavlovskyi* (0,1%) и *D. marginatus* (0,2%).

Часть разобранных по видам иксодид (1235 экз.) была исследована на КЭ индивидуально методом ИФА, при этом оказалось, что наиболее высокой вирусофорностью отличались клещи рода *Dermacentor*, особенно *D. nuttalli* (рисунок 1).

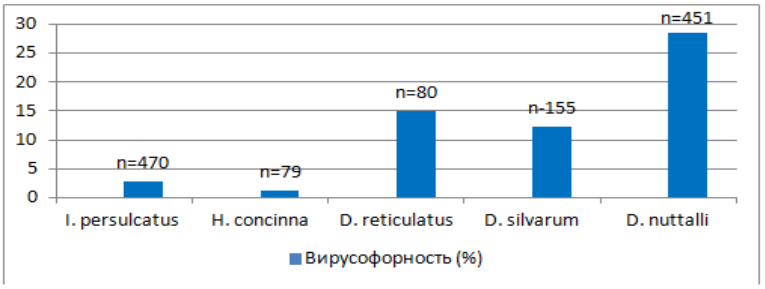



Рисунок 1 — Индивидуальная вирусофорность клещей разных видов, собранных с растительности в 2012–2013 гг. (ИФА)

Изучение индивидуальной вирусофорности переносчиков проводится в Республике Алтай с 2002 г., но первоначально объемы исследований были невелики, поэтому в статье показаны результаты мониторинга очагов КЭ за сезоны 2007–2013 гг. При этом все клещи рода *Dermacentor* были объединены в одну группу, так как в 2007–2011 гг. видовой идентификации этих иксодид не проводилось.

Вирусофорность иксодовых клещей, собранных с растительности в разных районах, была неоднородной. Среди клещей *I. persulcatus* она варьировала от 2,1% (в Усть-Коксинском районе) до 13,6% (в Майминском районе). Среди клещей рода *Dermacentor* от 16,7% (в Майминском районе) до 37,6% (в Усть-Канском районе). Самая низкая вирусофорность отмечалась в монодоминантных очагах клещевого энцефалита — персулькатусном Турачакском и дермацентoрном Кош-Агачском (5,3 и 3,0%), для которых характерна однородность ландшафтов (в первом случае — таежного, во втором — высокогорно-пустынного). На полиландшафтных территориях с разнообразием переносчиков, то есть в полидоминантных очагах КЭ, к которым относится большинство районов, вирусофорность (согласно t-критерия Стьюдента) была достоверно выше, чем в монодоминантных очагах клещевого энцефалита: 14,1 против 4,5% ($p<0,001$).

Кроме голодных иксодид, собранных с растительности, проводились исследования напитавшихся особей, доставленных в лабораторию пострадавшими от присасывания людьми. В целом исследовано 4093 экземпляра иксодид, в 426 экземплярах (10,4%) был обнаружен антиген вируса клещевого энцефалита (АГ ВКЭ).

Обращает на себя внимание, что вирусофорность *I. persulcatus*, снятых с людей была достоверно ниже, чем у таежных клещей, собранных с природы — 4,3 против 7,7% ($p<0,001$), а вирусофорность напитавшихся клещей рода *Dermacentor*, наоборот, значительно выше, чем голодных — 30,6 против 18,4% ($p <0,001$).

Если в сборах с растительности, как было сказано выше, преобладали клещи рода *Dermacentor*, то среди клещей, снятых с людей, доминировали клещи *I.persulcatus* — 84,4% (рисунок 2), причем доставлялись преимущественно самки таежного клеща (доля самцов *I.persulcatus* составила всего 1,6%).

Среди напитавшихся клещей рода *Dermacentor* доля самок составляла 55,5%, самцов — 44,5%.

Таблица 1 — Результаты исследования вирусофорности иксодовых клещей, собранных с растительности, в разрезе районов Республики Алтай (2007–2013 гг.)

| Районы | Исследовано экз. / из них полож. (вирусофорность, %) | | |
|---|---|---|---|
| | *I. persulcatus* | *Dermacentor* | *H. concinna* |
| Майминский | 125/17 (13,6%) | 352/59 (16,7%) | 47/4 (8,5%) |
| Чойский | 195/17 (8,7%) | 21/4 (19,1%) | 102/1 (0,9%) |
| Турачакский | 208/11 (5,3%) | 0 | 0 |
| Шебалинский | 150/16 (10,6%) | 133/26 (19,5%) | 3/1 |
| Онгудайский | 10/1 | 106/19 (17,9%) | 0 |
| Чемальский | 25/0 | 80/19 (23,7%) | 2/0 |
| Усть-Канский | 6/0 | 117/44 (37,6%) | 0 |
| Усть-Коксинский | 142/5 (2,1%) | 45/15 (33,3%) | 0 |
| Улаганский | 4/0 | 38/12 (31,5%) | 0 |
| Кош-Агачский | 0 | 99/3 (3,0%) | 0 |
| Всего | 865/67 (7,7%) | 991/182 (18,3%) | 154/6 (3,8%) |

Таблица 2 — Сравнительная вирусофорность голодных и напитавшихся иксодовых клещей (2007–2013 гг.)

| Виды клещей | Голодные клещи | | | Напитавшиеся клещи | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Исследовано проб | Из них положительных | Вирусофорность (%) | Исследовано проб | Из них положительных | Вирусофорность (%) |
| *I. persulcatus* | 865 | 67 | 7,7 | 1759 | 75 | 4,3 |
| *H. concinna* | 154 | 6 | 3,9 | 14 | 1 | 7,1 |
| *Dermacentor* | 991 | 182 | 18,4 | 310 | 95 | 30,6 |
| Всего | 2010 | 255 | 12,7 | 2083 | 171 | 8,2 |

Исследования показали, что эпидемиологическая роль клещей *H. concinna* невелика: их доля среди присасавшихся клещей была всего 0,7%, а вирусофорность самая низкая (3,8%). Учитывая это обстоятельство, в дальнейшем будем анализировать участие в эпидемическом процессе только клещей *I. persulcatus* и клещей рода *Dermacentor*.

Выяснилось, что в течение сезона вирусофорность напитавшихся клещей рода *Dermacentor* была подвержена изменениям: максимальная зараженность наблюдалась в начале сезона (в апреле), к июлю она падала (разница между этими показателями статистически достоверна ($p = 0,05$). На графике виден второй подъем вирусофорности в период выхода новой генерации (в сентябре), однако из-за небольших выборок разница показателей вирусофорности в июле и сентябре оказалась статистически не достоверна ($p>0,05$). Линия тренда отражает постепенное снижение вирусофорности клещей рода *Dermacentor* с апреля по октябрь. Активность этих иксодид продолжалась в среднем 210 дней — с начала апреля и до второй декады октября, хотя в отдельные годы сезон растягивался с третьей декады марта до первой декады ноября.

Вирусофорность напитавшихся клещей *I. persulcatus* в начале сезона и в конце сезона не имела статистически значимых различий ($p >0,05$), и была значительно ниже, чем у иксодид рода *Dermacentor* ($p<0,001$). Период активности основного переносчика был короче, чем у клещей рода *Dermacentor*: 120 дней — с первой декады апреля по первую декаду августа.

Исследования показали, что процент таежных клещей с АГ ВКЭ в полидоминантных очагах был выше, если сборы иксодид с растительности проводились вблизи населенных пунктов (то есть в антропургических очагах), поэтому наиболее высокая доля зараженных таежных клещей отмечалась в Майминском районе — территории с самой высокой плотностью населения. Высокий уровень вирусофорности иксодид, собранных рядом с населенными пунктами, объясняется тем, что окраины сел используются для выпаса сельскохозяйственных животных чаще, чем периферийные участки, поэтому обмен вирусом КЭ между иксодидами разных видов при совместном питании на скоте в таких очагах происходит с большей интенсивностью. Поголовье крупного рогатого скота

(КРС) в Республике Алтай за 2001–2012 гг. выросло с 117 до 230,5 тыс. голов, а мелкого рогатого скота (МРС) с 115,6 до 601,4 тыс. голов. Сельскохозяйственные животные не только прокармливают имаго иксодид, но и заносят клещей в населенный пункт, поэтому в селах нападение клещей в черте населенного пункта отмечается чаще, чем в городе: в среднем в 69,9% случаев против 38,0% случаев. Таким образом, за счет сельскохозяйственных животных вокруг сел сформированы антропургические очаги. Не случайно анализ показал, что между количеством населенных пунктов (т. е. количеством антропургических очагов КЭ) в муниципальных образованиях и обращаемостью населения с «укусами клещей» наблюдается сильная зависимость — коэффициент корреляции Пирсона r = 0,8 (p <0,05).

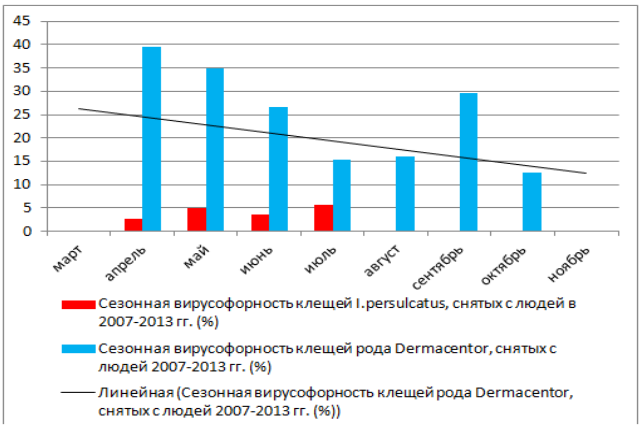



Рисунок 2 — Сезонная вирусофорность клещей *I.persulcatus* и клещей рода *Dermacentor*, снятых с людей в 2007–2013 гг.

Считается, что лоймопотенциал природных очагов клещевого энцефалита определяют два показателя, связанные с клещами: численность переносчиков и зараженность их вирусом клещевого энцефалита. Средняя численность иксодовых клещей в период наивысшей активности варьировала по годам от 55,3 до 119,9 особей на флаго-час. Проведенный корреляционный анализ по Пирсону выявил сильную статистически значимую связь между численностью клещей и обращаемостью населения по поводу их присасывания (r = 0,81, p <0,05), но показал отсутствие корреляционных связей между вирусофорностью переносчиков и другими показателями (заболеваемостью населения клещевым энцефалитом, обращаемостью населения, коллективным иммунитетом к вирусу КЭ).

Важное значение для оценки очагов клещевого энцефалита имеет генотипирование вирусов клещевого энцефалита, так как от этого зависит тяжесть заболевания заразившихся людей. Исследования последних лет выявили штаммовое разнообразие ВКЭ: изоляты вируса, выделенные от клещей, собранных в Горном Алтае, отнесены к сибирскому и европейскому генетическому типу [5, 9], а в одном случае определен микст-штамм, содержащий последовательности геномов сибирского и дальневосточного подтипов [10].

**Выводы.** В трансмиссии вируса КЭ на территории республики наряду с клещами *I. persulcatus* активно участвуют клещи рода *Dermacentor*: вирусофорность их выше, ареал шире, а период активности продолжительнее, чем у основного переносчика. Зараженность иксодид ВКЭ в полидоминантных очагах выше, чем в монодоминантных очагах (14,1 против 4,5%, p<0,001). В формировании и поддержании очагов КЭ большую роль играют сельскохозяйственные животные. Эпидемиологические особенности функционирования очагов учитываются при организации противоэпидемических мероприятий в Республике Алтай, где за 12 лет (2001–2012 гг.) заболеваемость КЭ снизилась в 2,3 раза — с 31,3 до 13,60/0000 (p<0,001).

**Литература**

1. Коренберг, Э.И. Основные черты эко-эпидемиологии клещевого энцефалита / Э.И. Коренберг, Ю.В. Ковалевский // Проблемы клещевых и паразитарных заболеваний. — СПБ., 2000. — С. 13–20.

2. Валицкая, А.В. Биологические особенности клеща *Ixodes persulcatus* p. *Sch.*, способствующие активизации природных очагов клещевого энцефалита в Тюменской области: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.В. Валицкая. — Тюмень, 2003. — 27 с.

3. Леонова, Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае. Вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты / Г.Н.Леонова. — Владивосток: Дальнаука, 1997. — 189 с.

4. Мельникова, О.В. Современное состояние очага клещевого энцефалита в окрестностях Иркутска / О.В. Мельникова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — № 4 (110). — С.27–30.

5. Якименко, В.В. Экологические предпосылки гетерогенности популяций хантавирусов и вирусов комплекса клещевого энцефалита в Западной Сибири: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06 / В.В. Якименко. — Москва, 2004. — 44 с.

6. Мельникова, О.В. Вирусологический мониторинг природных очагов клещевого энцефалита в Прибайкалье на основании индивидуального исследования иксодовых клещей: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / О.В. Мельникова. — Томск, 1994. — 24 с.

7. Аммосов, А.Д. Клещевой энцефалит / А.Д. Аммосов. — Кольцово, 2004. — 115 с.

8. Леонова, Г.Н. Некоторые особенности эпидемиологии клещевого энцефалита на юге Дальневосточного региона России / Г.Н.Леонова // Эпидемиол. и вакцинопрофилакт. — 2004. — № 2 (15). — С.23–26.

9. Детекция вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах, собранных в природном очаге Горного Алтая / О.В. Морозова [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2011. — Т. 56, № 2. — С. 23–26 .

10. Зараженность иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита в Турочакском и Шебалинском районах Республики Алтай / Т.И. Борисова [и др.] // Современные аспекты природной очаговости болезней: матер. Всерос. конф. с междунар. участием, посвящ. 90-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, Омск, 1–2 нояб. 2011 г. — Омск: ИЦ «Омский научный вестник», 2011. — С. 73–74.

## PREVALENCE OF TICKS INFECTED WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN THE POLYDOMINANT FOCI OF THE ALTAI REPUBLIC

**Shchuchinova L.D.**

*Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance in the Altai Republic, Gorno-Altaisk, Russia*

This paper shows the results of seven-year monitoring of the percentage of infected ticks. There are 5 mass species of Ixodes ticks of the Altai Republic. Ticks of the genus *Dermacentor* play an important role in formation of polydominant foci of tick-borne encephalitis (with *Ixodes persulcatus P.Schulze*). Dermacentor ticks have higher infection rates than taiga tick. The abundance of the infected Dermacentor ticks was higher in April (at the beginning of a season).

**Keywords:** tick-borne encephalitis, abundance of infected ticks, polydominant foci.

Поступила 06.09.2013

# ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ЭНТЕРОВИРУСОВ

**Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Дедюля К.Л., Богуш З.Ф., Поклонская Н.В.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Описаны основные свойства и принцип действия рекомбинантной тест-системы для выявления антигенов энтеровирусов методом иммуноферментного анализа. Основным компонентом тест-системы является рекомбинантный энтеровирусспецифический полипептид CE/E6, обладающий антигенными свойствами и перекрестной реактивностью в отношении антител к широкому кругу серотипов энтеровирусов. Представлены результаты полевых испытаний разработанной тест-системы с использованием клинического материала пациентов с энтеровирусной инфекцией, а также проб воды и пищевых продуктов.

**Ключевые слова:** энтеровирусная инфекция, диагностика, антиген энтеровируса, иммуноферментный анализ, рекомбинантный полипептид.

**Введение.** Как известно, иммуноферментный анализ (ИФА) является широко применяемым методом лабораторной диагностики и санитарной вирусологии, что обусловлено оперативностью его проведения, технологичностью, доступностью и достаточно высокой эффективностью аналитической процедуры. Данные характеристики ИФА приобретают особую актуальность в условиях мониторинговых исследований или регистрации вспышечной (групповой) заболеваемости, требующей быстрого проведения массовых обследований пациентов, установления этиологии регистрируемой инфекции, путей и факторов ее передачи.

До начала настоящих работ для этих целей в рамках осуществляемого эпиднадзора за энтеровирусными инфекциями (ЭВИ) неполиомиелитной природы лабораторная служба нашей страны использовала отечественную иммуноферментную тест-систему для выявления антигенов (АГ) энтеровирусов (ЭВ), сконструированную на основе цельновирионного антигенного компонента, представляющего собой пул неполиомиелитных ЭВ нескольких эпидемически значимых серотипов, накопленных в культурах клеток. Несмотря на достаточно высокие показатели аналитической чувствительности и специфичности данной тест-системы [1], технология ее производства имеет ряд уязвимых позиций. Среди них основными являются трудоемкость, длительность и высокая стоимость процедуры накопления культурального цельновирионного АГ, а также трудности его стандартизации. Эти недостатки, присущие цельновирионным ИФА-диагностикумам, могут быть устранены путем использования современных генно-инженерных технологий по созданию рекомбинантных белков-аналогов вирусных АГ. Как показывает мировой опыт, применение таких рекомбинантных белков при постановке ИФА позволяет получить высококачественные тест-системы, характеризующиеся широким спектром действия, высокой чувствительностью и почти 100%-й специфичностью. В настоящее время уже создан достаточно богатый арсенал рекомбинантных тест-систем с такими показателями в отношении ряда вирусных инфекций человека [2–5].

Статья посвящена описанию основных свойств рекомбинантной иммуноферментной тест-системы для выявления энтеровирусных антигенов с последующим изучением ее основных диагностических показателей и эффективности использования по назначению.

**Материалы и методы.** В качестве антигенного компонента для ИФА использовали рекомбинантный энтеровирусспецифический полипептид CE/E6, который получали в соответствии с технологией, разработанной авторами ранее [5]. Для экспрессии рекомбинантного полипептида (РП) применяли линию бактериальных клеток *E.coli* BL21(DE3), несущую векторную конструкцию pET-24b(+)/CE/E6 с клонированной последовательностью N-концевого фрагмента капсидного белка VP1, кодирующей 89 аминокислот, входящих в состав т. н. общего антигенного эпитопа [5, 6]. Выделение экспрессированного РП из бактериальных клеток *E.coli* BL21(DE3) осуществляли методом аффинной метал-хелатной хроматографии на колонках из набора «HisTrap HP Kit» фирмы Amersham Biosciences.

Для исследования спектра реактивности РП и его антигенной активности использовали диагностические сыворотки для реакции нейтрализации (производства ФГУП «ПИПВЭ» им. М.П. Чумакова РАМН», Россия).

В качестве аналога для сравнительной оценки показателей разработанной рекомбинантной ИФА тест-системы использовали отечественную коммерческую «Тест-систему для определения антигенов энтеровирусов методом иммуноферментного анализа» (ТУ РБ 100558032.092-2004, далее «ЭВ-ЦельновирИФА-АГ», Республика Беларусь). Диагностическую чувствительность созданного препарата вычисляли по формуле: количество положительных проб / количество истиннноположительных проб × 100%, диагностическую специфичность по формуле: количество отрицательных проб / количество истиннноотрицательных проб × 100%. В качестве истиннноположительных и истиннноотрицательных проб использовали пробы, оказавшиеся положительными или отрицательными при исследовании их методом ПЦР и методом ИФА с использованием «ЭВ-ЦельновирИФА-АГ» [7].

Пробы клинического материала (31 образец фекалий и 2 образца ликвора), полученные от пациентов с клиническим диагнозом «ЭВИ?», были доставлены из детской инфекционной клинической больницы г. Минска и областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья.

Пробы питьевой воды (51 образец) отбирались с помощью «Наборов для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства» (ТУРБ 100558032.048-2001) в контрольных точках на предприятиях ЗАО «Минский завод безалкогольных напитков, УП «Минскводоканал», «РЦ медицинской реабилитации и бальнеолечения».

Пробы сточных вод (6 образцов) были получены из Минского областного ЦГЭ и ОЗ. Пробы пищевых продуктов (48 образцов) отбирались по эпидпоказаниям и в плановом порядке.

Для выявления РНК ЭВ использовали соответствующую тест-систему для постановки ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс», Россия).

**Результаты и их обсуждение.** В основе действия рекомбинантной тест-системы лежит принцип постановки непрямого конкурентного метода ИФА. В выбранном формате использовались меченные ферментом вторичные АТ и РП CE/E6, иммобилизованный в качестве АГ на твердой фазе.

Следует отметить, что непрямая схема с использованием меченых антивидовых АТ является одной из наиболее распространенных схем ИФА [8]. На поверхности носителя иммобилизуется АГ-белок, к которому добавляется раствор, содержащий определяемый АГ и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител. Смесь инкубируется и после удаления несвязавшихся компонентов в нее добавляется фиксированная концентрация меченых антивидовых АТ. После инкубации и отмывки носителя детектируется ферментативная активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов. В данном варианте анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние содержащихся в образце различных эффекторов на каталитические свойства ферментной метки.

Используемая нами схема постановки ИФА состояла в следующем. Исследуемую пробу добавляли одновременно с иммунной сывороткой в сенсибилизированные РП лунки планшетов для конкурентного взаимодействия АГ пробы с АГ, сенсибилизированным на поверхности планшетов (им выступал РП), за специфическое связывание с АТ иммунной сыворотки. В результате такого взаимодействия происходило снижение показателя оптической плотности (ПОП) отрицательного контроля (ОК) по сравнению с ПОП положительного контроля (ПК) или пробы, содержащей энтеровирусный АГ.

Антигенная активность РП CE/E6 изучалась по его способности взаимодействовать в реакции нейтрализации с группоспецифическими противоэнтеровирусными сыворотками, содержащими АТ к представителям основных серогрупп рода Enterovirus (Коксаки В 1-6, ЕСНО 1–6, 7–13, 14–24, 15–22, 25–32) (рисунок 1).

Определение антигенной активности РП CE/E6 проводили путем постановки ИФА с использованием реагентов, входящих в состав коммерческой тест-системы «ЭВ-ЦельновирИФА-АГ» (Республика Беларусь). Для этого лунки планшетов для иммунологических реакций сенсибилизировали РП CE/E6 в дозе 1 мкг/мл. Антигенную активность определяли по способности сорбированных молекул белка реагировать с иммунной сывороткой (состоящей из пула противоэнтеровирусных сывороток), входящей в состав коммерческой тест-системы. Образовавшиеся иммунные комплексы выявлялись добавлением антивидовых АТ, меченых пероксидазой хрена, и хромогена ТМБ.

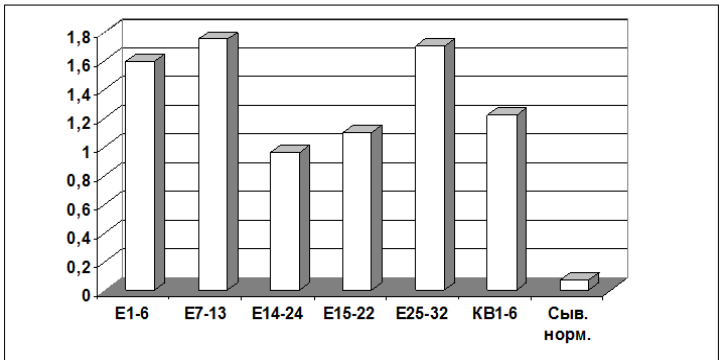



Рисунок 1 — Результаты взаимодействия РП CE/E6 с группоспецифическими иммунными сыворотками к основным серотипам ЭВ (ЕСНО 1–6, 7–13, 14–24, 15–22, 25–32, Коксаки В 1–6), в ПОП

Установлено, что изучаемый РП CE/E6 способен специфически взаимодействовать с группоспецифическими иммунными сыворотками к широкому кругу ЭВ (ЕСНО и Коксаки В), а также с иммунной кроличьей сывороткой, содержащей антитела к пулу ЭВ. Показано, что по своим антигенным свойствам РП CE/E6 не уступал коммерческому препарату смешанного цельновирионного антигена ЭВ.

Для оценки диагностических показателей разрабатываемой тест-системы показана способность РП CE/E6, адсорбированного на поверхности лунок планшета, конкурировать с ЭВ, являющимися основными представителями разных серогрупп (ЕСНО 1, 4, 6, 11, 14, 15, 20, 25, 30 и Коксаки В 1, 2, 3, 4, 5), за связывание с антиэнтеровирусными специфическими АТ (рисунок 2).

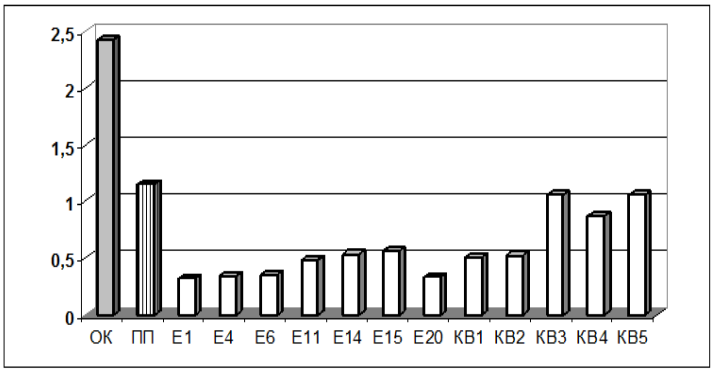



Рисунок 2 — Результаты детекции спектра ЭВ (ЕСНО 1, 4, 6, 11, 14, 15, 20, 25, 30 и Коксаки В 1, 2, 3, 4, 5) конкурентным методом ИФА, в ПОП

Установлено, что РП CE/E6 по способности взаимодействовать с иммунной сывороткой не уступал вышеперечисленным вирусам. При детекции энтеровирусных АГ ПОП снижался по сравнению с ПОП ОК более чем в 2 раза, что свидетельствовало о высокой диагностической специфичности и чувствительности рекомбинантной тест-системы.

Учитывая назначение разрабатываемой тест-системы, были проведены ее полевые испытания с использованием проб клинического материала, воды и пищевых продуктов. При исследовании клинического материала пациентов (31 образца фекалий и 2 образцов ликвора) с клиническим диагнозом «ЭВИ?» положительные результаты выявления энтеровирусных АГ (рисунок 3) регистрировались в 69,7% проб (только фекалий).

Средний уровень обнаружения АГ ЭВ в пробах из объектов окружающей среды составил 15,24% (таблица). Наибольший процент положительных проб регистрировался в сточных водах (66,7%). Уровень выявления энтеровирусных АГ в пробах пищевых продуктов и питьевых вод, отобранных по эпидпоказаниям, составил 20,83 и 3,92% соответственно.

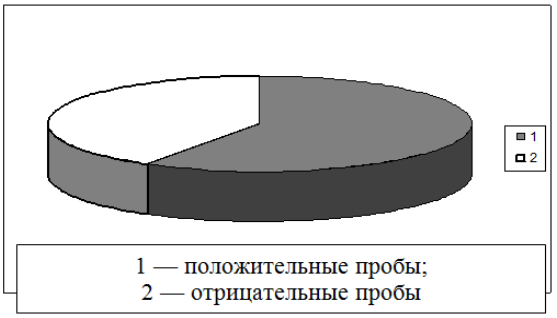



Рисунок 3 — Результаты выявления АГ ЭВ в образцах клинического материала, %

Таблица — Выявление АГ ЭВ в пробах из объектов окружающей среды

| Наименование проб | Количество исследованных | Количество положительных | % положительных |
|---|---|---|---|
| Сточные воды | 6 | 4 | 66,7 |
| Питьевые воды | 51 | 2 | 3,92 |
| Пищевые продукты | 48 | 10 | 20,83 |

Все положительные на наличие энтеровирусных АГ клинические и санитарно-вирусологические пробы были подтверждены методом ПЦР по выявлению энтеровирусной РНК, что свидетельствовало о высокой диагностической эффективности разработанной тест-системы и возможности ее использования по назначению.

Сравнение результативности применения разрабатываемой рекомбинантной тест-системы и ее коммерческого аналога (тест-системы «ЭВ-ЦельновирИФА-АГ» ) путем параллельного исследования проб клинического материала, воды и пищи показало полную сопоставимость полученных данных.

Выводы. Создана современная технология производства рекомбинантной тест-системы для выявления АГ ЭВ методом ИФА. Успешно проведены ее полевые испытания, показана сопоставимая результативность в сравнительных исследованиях с коммерческой цельновирионной тест-системой. Полученные данные являются основанием для освоения и организации серийного производства разработанного диагностического препарата. Имеющиеся технологические преимущества рекомбинантной тест-системы перед существующим аналогом создают хорошие перспективы ее внедрения и широкого использования в практическом здравоохранении, что будет способствовать повышению качества и эффективности лабораторного контроля и эпиднадзора за циркуляцией возбудителей ЭВИ на уровне человеческой популяции и объектов окружающей среды.

**Литература**

1. Лабораторное изучение вспышек энтеровирусных инфекций с помощью иммуноферментных тест-систем в Республике Беларусь / О.Н. Казинец [и др.] // Всерос. науч. конф. с междунар. участием «Медицинские иммунобиологические препараты в 21 веке: разработка, производство и применение», Уфа, Россия, 6–8 июня 2005 г.: сб. ст.: в 2 ч. — Уфа, 2005. — Ч. 2. — С. 200–201.

2. Serological immunoassay for detection of hepatitis E virus on the basis of genotype 3 open reading frame 2 recombinant proteins produced in Trichoplusia ni larvae / N.J. de Oya [et al.] // J. Clin. Pathol. — 2008. — Vol. 61, № 5. — P. 623–626.

3. Immunoassay with cytomegalovirus early antigens from gene products p52 and CM2 (UL44 and UL57) detects active infection in patients with chronic fatigue syndrome / S.H. Beqaj [et al.] // J. Virol. Methods. — 2013. — Vol. 187, № 1. — P. 114–120.

4. Medical virology: a practical approach / Ed. by U. Desselberger. — NY: Oxford University Press, 1995. — 147 p.

5 Дедюля, К.Л. Использование рекомбинантоного энтеровирусспецифического полипептида в качестве антигена при разработке диагностической тест-системы / К.Л. Дедюля, Н.В. Поклонская, Т.В. Амвросьева // Воен. медицина. — 2010. — № 3. — С. 87–91.

6. Получение рекомбинантного полипептида и изучение его антигенных свойств для создания диагностических тест-систем / К.Л. Дедюля [и др.] // Здравоохранение. — 2007. — № 11. — С. 13–17.

7. Altman, D.G. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity / D.G. Altman, J.M. Bland // BMJ. — 1994. — № 308. — P. 1552–1554.

8. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. — М.: Высш. шк., 1991. — 288 с.

## PRODUCTION TECHNOLOGY AND EXPERIENCE USING RECOMBINANT ENZYME IMMUNOASSAY KIT FOR ENTEROVIRUSES ANTIGEN DETECTION

**Amvrosieva T.V., Kazinetz O.N., Dziadzula K.L., Bogush Z.F., Poklonskaya N.V.**

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

The study presents the results of basic properties investigation of the recombinant enzyme immunoassay kit for the detection of enteroviruses antigen, based on the scheme of setting a competitive enzyme immunoassay. The developed technology involves the using of enteroviruspecific recombinant polypeptide CE/E6, which is having antigenic properties and cross-reactivity to antibodies against different serotypes EV. With using an experimental model developed recombinant kit it was investigated clinical samples, water and food for the presence of enteroviruses antigen.

**Keywords:** enterovirus, diagnostics, enterovirus antigen, an enzyme immunoassay, the recombinant polypeptide.

Поступила 04.09.2013

## АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ ДЕНГЕ

**Богданова Н.Л., Рустамова Л.М., Красько А.Г., Петкевич А.С.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Специфические средства, применяемые для лечения заболевания Денге, до настоящего времени не разработаны. Проведены исследования на наличие протективных свойств у препаратов на растительной основе и группы иммуномодуляторов на инбредных мышах линии Balb/c, инфицированных вирусом Денге. Наиболее эффективными препаратами для лечения животных, зараженных вирусом Денеге, были панавир и коргликон (42 и 30% защиты соответственно; группа препаратов на растительной основе); циклоферон защищал на 35% (иммуномодуляторы).

**Ключевые слова:** флавивирусы, лихорадка Денге, растительные лекарственные средства, защитные свойства, иммуномодуляторы

**Введение.** Лихорадка Денге относится к трансмиссивным зоонозам. Возбудитель лихорадки — РНК-содержащий вирус семейства *Flaviviridae*. Заболевание является эндемичным более чем для 100 стран Африки, Америки, Восточного Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана. Распространение лихорадки происходит в связи с расширением географического распределения вируса в его переносчиках — комарах, основными из которых являются комары вида Aedes aegypti, обитающие, главным образом, в городских районах. Заболевание может быть завезено в любую точку мира, в том числе, в республику Беларусь с эндемичных территорий в связи с глобальным изменением климата, появлением новых видов растений и животных, развитием международных и туристическими связей, миграцией населения.

Геморрагическая форма лихорадки Денге сопровождается носовыми кровотечениями, кровохарканье, сопутствует мелена. Могут поражаться почки с развитием олигурии и протеинурии. При тяжелых формах, которые при лихорадке Денге редки, может развиться инфекционно-токсический шок. Геморрагическая лихорадка Денге обусловлена реинфицированием разными типами вируса Денге с развитием острой иммунокомплексной патологии. Резко выраженная интоксикация сопровождается развитием ДВС-синдрома. при этом III и IV степени характеризуют как шоковый синдром Денге. При тяжелом течении болезни большое значение имеют реанимационные мероприятия, направленные на восстановление жизненноважных функций организма. Летальность при лихорадке Денге составляет 2–10%.

Средства лечения и профилактики инфекции, вызываемой вирусом Денге, не разработаны. Создание эффективных химио- и других препаратов при этом заболевании является задачей актуальной [1–6].

**Цель** работы — оценка защитных свойств препаратов на растительной основе и иммуномодуляторов на лабораторных животных — мышах линии BALB/c.

**Материалы и методы.** ***Вирусы.*** В работе использовали вирус Денге, изолят от больного, с серологически подтвержденным диагнозом заболевания лихорадкой Денге, который хранится в музее специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

***Препараты.*** Исследованы препараты следующих групп: препараты на растительной основе, содержащие гликозиды, алкалоиды (и прочие активные компоненты в своем составе): коргликон 6%, 1 мл № 5 амп., производитель ООО «Опытный завод ГНЦЛС», Украина; целанид, производитель ЗАО «Фармцентр Вилар», Россия; аллапенин, табл. 0,25 мг № 10, производитель ЗАО «Фармцентр Вилар», Россия; панавир 0,04 мг/мл 5 мл № 5, производитель ООО Медицинский центр «Эллара» РФ. Иммуномодуляторы: циклофосфан, производитель «Медиафарм», Россия; циклоферон 12,5%, 2 мл № 5 амп., производитель «ПОЛИСАН», РФ; амизон, табл. 25 мг № 10 производитель ОАО «Фармак», Украина; амиксин, табл. 125 мг № 10 производитель ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», Россия.

Препараты использовались в форме таблеток, капсул и в ампулах. Лекарственное средство животным вводили перорально или интраабдоминально по лечебно-профилактической схеме — в максимальных нетоксичных дозах в объеме 0,2 мл однократно: за 1 ч до инфицирования, далее — ежедневно в течение 12 сут включительно. В качестве контроля использовали группу мышей, зараженных вирусом без введения препарата в той же дозе, что и в опыте. В качестве плацебо — физиологический раствор, вводимый животным по 0,2 мл внутрибрюшинно.

***Животные.*** В работе использовали инбредных мышей линии BALB/c массой до 4 г. Поставки животных осуществляли из вивария ГУ НПЦ института фармакологии и биохимии НАНБ г. Минска. Срок наблюдения составлял 21 день от момента заражения. Разведения вируса готовили на физиологическом растворе. Животных заражали интрацеребрально в дозе 1000 БОЕ/мышь, что составляло 10 LD50, в объеме 0,03 мл. Это обеспечивало 90–100% гибели контрольных животных. Препарат разводили на бидистиллированной воде. Срок наблюдения составлял три инкубационных периода (21 день). Действие препарата оценивали по увеличению выживаемости и удлинению срока жизни опытных групп по сравнению с контролем. Контрольной группе животных в качестве плацебо также интрацеребрально инокулировали только физиологический раствор.

Пригодными для эксперимента признаны только те животные, которые подтверждены клинически здоровыми, но восприимчивы к соответствующим вирусам, применяемым в исследовании. Животные содержались на стандартном рационе с достаточным количеством питьевой воды. Все манипуляции с ними в процессе проведения эксперимента осуществляли с применением седативных средств и в соответствии с ветеринарным законодательством. Животные содержались в клетках по десять мышей; помет новорожденных мышата — вместе с матерями (одна семья в клетке). Для питания в процессе эксперимента использовался сухой и сочный корм. Пищу и питьевую воду животные получали в неограниченном количестве в течение всего периода проведения работ. При проведении исследований соблюдены все общепринятые меры предосторожности (лабораторная одежда, маска, перчатки, сменная обувь). Работа с зараженными вирусом Денге культурами клеток и животными выполнена в условиях биобезопасности уровня Р3-Р4 в соответствии с СП 1.2.011-94 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

Статистическую обработку различий выживаемости между группами животных, обработанных препаратами, и контролем, проводили, используя t-критерий Стьюдента. Обработанные данные считали статистически достоверными при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. ***Оценка защитных свойств препаратов на растительной основе, содержащих гликозиды и алкалоиды.*** При применении препаратов, содержащих гликозиды и алкалоиды, на мышах линии BALB/c, инфицированных вирусом Денге, получены следующие результаты: при назначении препарата коргликон в дозе 0,6 мкг/мышь (i/p) по описанной выше лечебно-профилактической схеме защита животных составила 30% по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения, а СПЖ — 11 дней, УСЖ — 4 дня. Защита при применении препарата целанид в дозе 2 мкг/мышь (i/p) — 28%, СПЖ — 9 дней, УСЖ — 2 дня; а препарата аллапенин в дозе 5 мкг/мышь (per os) — 10%, СПЖ — 7 дней, УСЖ — до 1 дня; панавир в дозе 0,8 мкг/мышь (i/p) — 42%, СПЖ — 11 дней, УСЖ — 4 дня (рисунок 1).

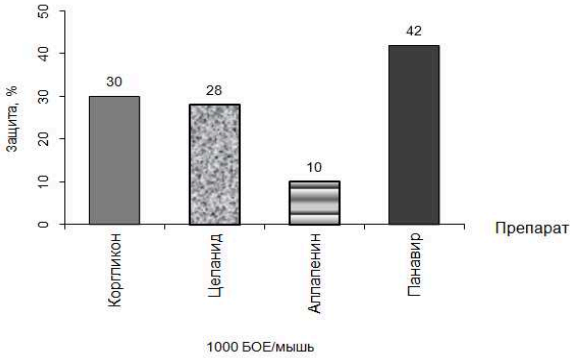



Рисунок 1 — Влияние препаратов на растительной основе, содержащих гликозиды и алкалоиды на выживаемость мышей линии Balb/c, зараженных вирусом Денге

***Оценка защитных свойств препаратов группы иммуномодуляторов.*** Эффект защиты препаратов группы иммуномодуляторов при их назначении животным оценен следующим образом. Циклофосфан в дозе 40 мкг/мышь при введении интраабдоминально по лечебно-профилактической схеме (описана выше) защищал мышей на 25%, СПЖ — 8 дней, УСЖ составило 1 день. Препарат циклоферон в дозе 40 мкг/мышь при том же способе введения, что и циклофосфан, защищал животных на 35%, СПЖ при этом составила 14 дней, а УСЖ — 7 сут. Препараты амизон и амиксин при пероральном применении в дозах 30 и 20 мкг/мышь соответственно защищали мышей на 12 и 15%; СПЖ составила по 8 дней, УСЖ — по 1 дню (рисунок 2).

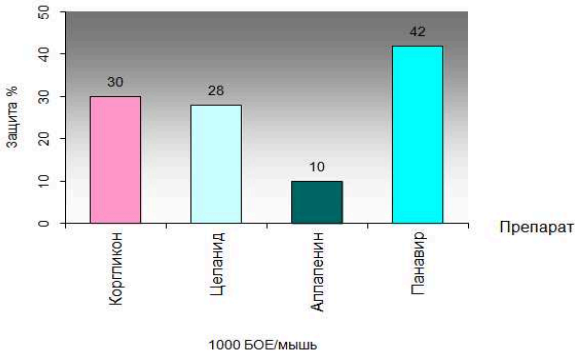



Рисунок 2 — Влияние препаратов группы иммуномодуляторов на выживаемость мышей линии Balb/c, зараженных вирусом Денге

**Выводы.** Впервые нами установлены протективные свойства у препаратов на растительной основе, содержащих алкалоиды, гликозиды (другие активные компоненты в своем составе) и препаратов группы иммуномодуляторов, при инфицировании экспериментальных животных вирусом Денге; степень защиты при назначении лекарственных средств по лечебно-профилактической схеме распределились следующим образом:

• группа препаратов на растительной основе, содержащие гликозиды и алкалоиды — коргликон, целанид, аллапенин, панавир защищали мышей от инфекции на 10–42 %

• препараты группы иммуномодуляторов — циклофосфан циклоферон, амизон, амиксин защищали лабораторных животных на 12–35%.

Наиболее эффективными препаратами для лечения животных, зараженных вирусом Денге, были панавир (42% защиты) и коргликон — защищал на 30% (группа препаратов на растительной основе); циклоферон – на 35% (иммуномодуляторы).

**Литература**

1. Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity / F. Narvaez [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. — 2011. — Vol. 5, № 11. — P. 1397.

2. Unusual dengue virus 3 epidemic in Nicaragua, 2009 / G. Gutierrez [et al.] // PLoS Negl .Trop. Dis. — 2011. — Vol. 5, № 11. — P. 1394.

3. Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin / R. Takhampunya [et al.] // J. Gen. Vir. — 2006. — Vol. 87. — P. 1947–1952.

4. Inhibition of dengue virus infections in cell cultures and in AG129 mice by a small interfering RNA targeting a highly conserved sequence / D.A. Stein [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 85, № 19. — P. 10154–10166.
5. Inhibition of Dengue Virus Serotypes 1 to 4 in Vero Cell Cultures with Morpholino Oligomers / R.M. Kinney [et al.] // J. Virol. — 2005. — Vol. 79, № 8. — P. 5116–5128.
6. Peng, T. The Animal Models for Dengue Virus Infection / T. Peng, J. Zhang, J. An // Dengue Bull. — 2004. — Vol. 28.

## ACTIVITY OF SYNTHETIC DRUGS AND PLANT FOR EXPERIMENTAL DENGUE HEMORRHAGIC FEVER

**Bogdanova N.L., Krasko A.G., Rustamova L.M., Petkevich A.S.**

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

At present, the specific drug products used to treat the disease dengue have not been developed. We investigated the presence of protective properties of plant-based drugs and of the immunomodulators in inbred mice of the Balb/c, Dengue virus infected. The first time, we obtained the following data in the appointment of drugs for treatment and prevention scheme:

• a group of plant-based drugs — korglikon, tselanid, allapenin, panavir protect animals from infection by 10–42%

• of immunomodulatory drugs — cyclophosphamide, tsikloferon, amizon and amiksin defended laboratory animals by 12–35%.

Thus the most effective drugs for the treatment of animals, infected with the Dengue virus, were: panavir — 42% protection, korglikon — 30% and tsikloferon — 35% protection.

**Keywords:** flaviviruses, Dengue fever, plant-based medicines, the protective properties, immunomodulators.

Поступила 06.09.2013

## ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ПИНОСТРОБИНА И ТЕКТОХРИЗИНА

**Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Соколова Н.С., Жанымханова П.Ж., Дуйсенбаев Н.К., Мукушева Г.К., Адекенов С.М., Березин В.Э.**

*Институт микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан;*

*АО «Международный научно-производственный холдинг "Фитохимия"», Караганда, Казахстан*

**Резюме.** Проведены сравнительные исследования противовирусных свойств растительных препаратов пиностробин и тектохризин. Показано, что препарат тектохризин обладает более выраженными противовирусными свойствами по сравнению с пиностробином. Установлено, что в дозе 8 мг/кг тектохризин может снижать инфекционность вируса гриппа более, чем на 1 Lg.

**Ключевые слова:** флавоноиды, пиностробин, антивирусные свойства, куриные эмбрионы.

**Введение.** В настоящее время для лечения инфекционных заболеваний большое значение приобретают биологически активные вещества растительного происхождения, обладающие меньшим побочным действием, чем синтетические препараты и сходные по структуре и действию с естественными компонентами организма человека. Среди биологически активных веществ известны такие обширные классы, как алкалоиды, изопреноиды, фенольные соединения и их производные [1–7]. Многие вещества, входящие в перечисленные классы химических соединений, обладают иммуностимулирующей, антимикробной и антивирусной активностью. Среди различных классов растительных соединений, обусловливающих их лечебный эффект, значительное место занимают флавоноиды. Обладая широким спектром фармакологической активности, флавоноиды применяются в медицине как желчегонные, гипоазотемические, гепатозащитные, противоязвенные, капилляроукрепляющие и противовоспалительные средства. Удачное сочетание малой токсичности и высокой фармакологической активности делает их чрезвычайно перспективными для профилактики и лечения ряда серьезных заболеваний [1–7].

Анализируя масштабы исследований в области химии, фармакологии и технологии флавоноидов, к сожалению, можно сделать вывод об отсутствии системного подхода при изучении связи

структура-активность у различных групп флавоноидов. Это связано не только со сложной структурой молекулы флавоноидов, но и недостаточной изученностью характера их воздействия на органы, ткани и другие мишени в организме. Кроме того, в процессе изучения таких фитопрепаратов исследователи сталкиваются с проблемой их биодоступности и прохождения через биологические мембраны, испытывают затруднения в определении вектора биологического воздействия. В настоящее время появились публикации, посвященные определению взаимосвязи между строением агликона флавоноидов и их биологической активностью, что весьма актуально[1–7].

**Целью** наших исследованиях в рамках изучения влияния структуры соединения на его биологическую активность была изучена способность пиностробина и тектохризина (рисунок 1) подавлять репродукцию вируса гриппа. Выбор именно этих флавоноидов был обусловлен рядом причин, основными из которых являлась способность пиносторобина разрушать морфологию некоторых вирусов, стабильностью метоксилированных производных флавоноидов к ферментативным процессам в макроорганизме, а также возможностью проведения аналогий между кверцетином и таксифолином.

Материалы и методы Антивирусную активность препарата исследовали на вирусе гриппа, штаммы А/крачка/Южная Африка/1/61(H5N3) и А/Алматы/8/98 (H3N2). Вирусы выращивали в аллантоисной полости 10–11-дневных куриных эмбрионов в течение 36–48 ч при 37°С.

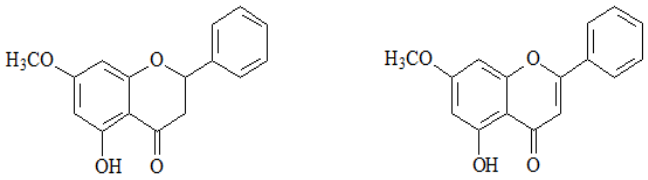
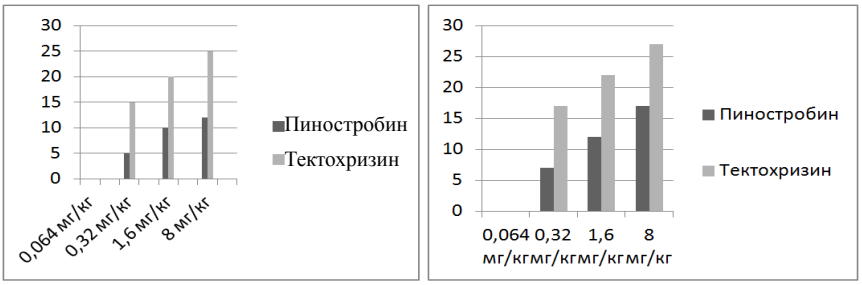



Рисунок 1 — Структура метоксилированных флавоноидов

Антивирусную активность препарата определяли при заражении куриных эмбрионов двумя способами: а) ингибирование репродукции вируса определяли при одновременном инокулировании в куриные эмбрионы исследуемого препарата в разных концентрациях и вируса в количестве 100 ЭИД50 с последующим определением титра гемагглютинации; б) вирулицидную активность определяли путем обработки вируссодержащего материала препаратом при 37°С с последующим титрованием инфекционности обработанного материала. Инфекционный титр вирусов определяли по методу Reed и Muench [8–10].

Результаты и обсуждение Антивирусная активность препаратов была исследована в интервале доз от 0,064 до 8 мг/кг массы куриного эмбриона. Установлено, что в дозе 0,064 мг/кг пиностробин и тектохризин не обладают способностью подавлять репродукцию вируса в отношении вируса гриппа человека, штамм А/Алматы/8/98 и вируса гриппа птиц А/крачка/Южная Африка/1/61(H5N3) (рисунок 2). При увеличении дозы препаратов до 8 мг/кг показано, что тектохризин проявляет более выраженную вирусингибирующую активность по сравнению с пиностробином.




А/Алматы/8/98 А/крачка/Южная Африка/1/61

По оси ординат процент подавления репродукции 100 инфекционных доз вируса, по оси абсцисса — доза препарата

Рисунок 2 — Сравнительная вирусингибирующая активность пиностробина и тектохризина

При изучении вирулицидной активности препаратов пиностробина и тектохризина в дозе 8 мг/кг веса установлено, что тектохризин способен подавлять инфекционность вирусов гриппа более, чем на 1lg, что подтверждает способность исследуемых препаратов влиять на морфологию вирионов гриппа.

**Выводы.** Таким образом, показано, что пиностробин и тектохризин в интервале доз до 8 мг/кг веса не обладали ярко выраженными вирусингибирующими свойствами. Однако установлено, что восстановление двойной связи кольца флавоноида у метоксилированных соединений увеличивает противовирусную активность соединения Кроме того, тектохризин оказался способен снижать инфекционность вируса гриппа более, чем на 1,0 lg, что сопоставимо с антивирусной активностью ряда коммерческих лекарственных препаратов.

**Литература**

1. Monto, A.S. Antivirals and influenza: frequency of resistance / A.S. Monto // Pediatr. Infect. Dis. J. — 2008. — Suppl. 10. — P. 110–122.
2. Николаев, С.М. Растительные лекарственные препараты при повреждениях гепатобилиарной системы / С.М. Николаев. — Новосибирск: Наука, 1992. — 153 с.
3. Самылина, И.А. Основные направления исследований лекарственных растений на современном этапе / И.А. Самылина, И.С. Грицаенко, Н.К. Горчакова // Современные аспекты изучения лекарственных растений: науч. тр. — М., 1995. — Т. 34. — С. 3–6.
4. Хобракова, В.Б. Влияние милдроната йодистого на состояние иммунной системы организма / В.Б. Хобракова, С.Ц. Аюшеева // Сиб. мед. журн. — 2006. — № 1. — С. 67–69.
5. Sreejayan, N. Free radical scavenging activity of curcuminoids / N. Sreejayan, N.A. Rao Mysore // Arzneim — Forsch. — 1996. — Vol. 46, № 2. — P. 169–171.
6. Саратиков, А.С. Родиола розовая (золотой корень) / А.С. Саратиков, Е.А. Краснов. — Томск: Изд-во Томск. ун-та, 2004. — 292 с.
7. Activity investigation of pinostrobin towards herpes simplex virus-1 as determined by atomic force microscopy / N. Wu [et al.] // Phytomedicine. — 2011. — Vol. 15, № 18 (2–3). — P. 110–118.
8. Шнейдер, М.А. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств / М.А. Шнейдер. — Минск: Наука, 1977. — 150 с.
9. Reed, L. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L. Reed, H. Muench // Am. J. Hyg. — 1938. — Vol. 27. — P. 493–497.
10. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. — М., 1975. — 295 с.

## ANTIVIRAL PROPERTIES PINOSTROBIN AND TEKTOCHRIZINE

**Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Sokolova N.S., Zhanymkhanova P.Zh., Duysenbaev N.K., Mukusheva G.K., Adekenov S.M., Berezin V.E.**

*Institute of microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan*

*"Phytochemistry" Ltd, Karaganda, Kazakhstan*

A comparative study of the antiviral properties of herbal preparations and pinostrobin tektohrizin was made. It is shown that the tektohrizin has more pronounced antiviral properties compared with pinostrobin/ Established that a dose of 8 mg/kg tektohrizin can reduce infectivity of influenza virus for more than one Lg.

**Keywords:** flavonoids, pinostrobin, antiviral properties, chicken embryos.

Поступила 02.09.2013

## ПАРВОВИРУС В19 — ОСНОВНОЙ ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ СЕГОДНЯ ИЛИ «СВИДЕТЕЛЬ» ЗАБОЛЕВАНИЯ?

**Вайханская Т.Г.[1], Гуль Л.М.[1], Шумовец В.В.[1], Севрукевич В.И.[1], Богуш З.Ф.[2], Амвросьева Т.В.[2]**

*[1]РНПЦ «Кардиология»;*

*[2]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе представлены результаты вирусологического исследования спектра кардиотропных вирусных патогенов (энтеровирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус ветряной оспы, пар-

вовирус В19, аденовирус, вирусы простого герпеса 1 и 2 типа, вирус герпеса человека 6 типа и цитомегаловирус) у пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) и анализ влияния вируспозитивности на клиническое течение заболевания. В результате проведенных исследований общий уровень детекции генетических маркеров исследуемых вирусов у пациентов с ДКМП составил 34,1%. При этом нуклеиновые кислоты вирусных агентов выявлены в 75% эндомиокардиальных биоптатов со значительным доминированием детектированных геномов парвовируса В19 и вируса герпеса человека 6 типа.

**Ключевые слова:** дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), кардиотропные вирусы, нуклеиновые кислоты (НК)

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) — наиболее часто встречающееся среди первичных поражений миокарда заболевание, характеризующееся увеличением полостей сердца и снижением его систолической функции. Среди этиологических факторов патогенеза ДКМП выделяют вирусные инфекции (кардиотропные), аутоиммунные нарушения и генетические аномалии [1, 2].

В перечне вирусных агентов, определяемых в биологических тканях пациентов с ДКМП, в последнее десятилетие доминируют парвовирус В19 (ПВ В19), вирусы простого герпеса (ВПГ) и герпеса человека (ВГЧ) 6 и 8 типов [3–8]. Далее в рейтинге ассоциируемых с ДКМП инфекций следуют энтеровирусы (ЭВ).

Значительную роль среди кардиотропных вирусов играет цитомегаловирус (ЦМВ), ДНК которого обнаруживается в 15% образцов эндомиокардиальных биопсий пациентов с ДКМП [10]. Следует отметить особое значение ЦМВ, так как с ним ассоциируется наибольшее количество посттрансплантационных осложнений вирусной этиологии. Сегодня спектр кардиотропных вирусов значительно расширен и пополнен эритровирусами, вирусом Эпштейна–Барра (ВЭБ), вирусами простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ), Варицелла–Зостер вирусом (ВЗВ), вирусами герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6 т) и 8 типа, вирусом гепатита С и вирусом иммунодефицита человека [9–12].

**Цель**. С учетом доказанной связи ряда вирусных агентов с развитием кардиомиопатий, целью выполняемого исследования явилось изучение спектра вирусных патогенов, выявляемых у пациентов с ДКМП, и анализ влияния вируспозитивности на клиническое течение заболевания.

**Материалы и методы.** В исследование включены пациенты с диагнозом ДКМП, установленным согласно критериям Международной рабочей группы по кардиомиопатиям [1, 2]. Исследование одобрено местным этическим комитетом.

Обследовано 140 пациентов II–III функциональных классов (ФК) по NYHA с диагностическими критериями, подтверждающими ДКМП: 36 женщин (25,7%) и 104 мужчин (74,3%) в возрасте от 17 до 59 лет (средний возраст 46,7±11,6 года). Контрольную группу составили 30 здоровых добровольцев, сопоставимых по гендерно-возрастному признаку с основной группой пациентов.

Всем больным был проведен комплекс обследований, включающий физикальное обследование, регистрацию ЭКГ, селективную коронароангиографию, суточное мониторирование ЭКГ, эхокардиографию (ЭхоКГ), спировелоэргометрию, лабораторные анализы крови с определением уровней мочевины, креатинина, электролитов, С-реактивного белка (СРБ) и мозгового натрийуретического пептида (МНП), а также вирусологический скрининг образцов крови и эндомиокардиальных биоптатов с помощью молекулярно-генетических методов.

Эндомиокардиальную биопсию (ЭМБ) проводили по стандартной методике с забором миокардиального материала из верхушки правого желудочка щипцами для биопсии. При клапанной хирургической коррекции и при ортотопической трансплантации сердца забор биоптатов проводился из верхушек ПЖ\ЛЖ, перегородочной области и из ушек предсердий.

Реакцию обратной транскрипции для получения энтеровирусной кДНК осуществляли с использованием набора для обратной транскрипции «RevertAid» производства «Fermentas», Литва и «РЕВЕРТА-L» производства «АмплиСенс», Россия. Амплификацию вирусных нуклеиновых кислот проводили с использованием коммерческих тест-систем производства «АмплиСенс», Россия. Для диагностики ЭВ, ВЗВ и ПВ В19 использовали ПЦР тест-системы с учетом результатов в реальном времени. АдВ, ВПГ, ЦМВ, ВГЧ 6т, ВЭБ детектировали с помощью ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов.

Статистический анализ результатов исследования проводили на основе биостатистических методов с использованием компьютерных программ Statistica для Windows (версия 7.0) и SPSS для

Windows (версия 20.0). Количественные параметры представлены в виде среднего арифметического значения (M) и среднеквадратичного отклонения среднего (sd). Для статистического анализа количественных данных использовался парный коэффициент Стьюдента (t) и применялся корреляционный анализ, для качественных показателей анализ достоверности различий частот проводился при помощи критерия $\chi 2$ и в точном решении Фишера. В случае заметных отклонений изучаемых распределений от нормального использовался критерий Манна–Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Комплексное обследование проведено у 140 пациентов с ДКМП в возрасте от 17 до 59 лет (мужчины 104/74,3%, ФК NYHA 3,02±0,3; синусовый ритм выявлен у 111/79,3%; фибрилляция предсердий — у 29/20,7%; желудочковые тахиаритмии — у 45/ 32,1%; полная блокада левой ножки п. Гиса — у 37/26,4%; средняя характеристика QRS комплекса составила 124±25 мс). Клиническая характеристика обследованных больных представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Клиническая характеристика 140 пациентов с ДКМП, включенных в исследование

| Параметры | Показатели, M±sd | Количество пациентов с расчетным показателем |
|---|---|---|
| Возраст, лет | 46,7±11,6 | 140 |
| ФК по NYHA, кл | 3,02±0,3 | 140 |
| Конечно-систолический объем левого желудочка, мл | 224,5±86,5 | 140 |
| Конечно-диастолический объем левого желудочка, мл | 297±97,4 | 140 |
| Фракция выброса левого желудочка, % | 26,3±9,61 | 140 |
| Конечно-систолический объем правого желудочка, мл | 62,7±35,4 | 140 |
| Конечно-диастолический объем правого желудочка, мл | 99,4±47,7 | 140 |
| Фракция выброса правого желудочка, % | 39,3±11,5 | 140 |
| **Результаты вирусологического исследования** | **Кол-во пациентов с исследованиями, n (%)** | **Кол-во пациентов с расчетным показателем, n** |
| Вирусологический скрининг:<br>Позитивный гемотест ПЦР<br>Позитивный ПЦР тест эндомиокардиальных биптатов | <br>19(14,1)<br>27 (75,0) | <br>135<br>36 |

Клинический материал (кровь, эндомиокардиальные биоптаты) исследовали с помощью молекулярно-генетических технологий для выявления генетических маркеров (ДНК, РНК) 8 возбудителей вирусных инфекций, ассоциируемых с развитием ДКМП (ВПГ, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ 6 т, ВЗВ, ПВ В19, АдВ и ЭВ).

Проведено генетическое исследование 102 образцов миокарда 36 пациентов. Забор эндомиокардиальных биоптатов (ЭМБ) был проведен во время хирургической клапанной коррекции у 20 больных, во время проведения операции ортотопической трансплантации сердца — из 14 эксплантированных сердец, и с помощью стандартной чрезкожной катетерно-эндокардиальной процедуры ЭМБ выполнены у 2 пациентов. Проведенные нами исследования продемонстрировали высокий уровень вирусной персистенции в кардиомиоцитах пациентов с ДКМП: в 75% ЭМБ (27 из 36) присутствовал генетический материал одного или нескольких вирусных патогенов. При этом положительные результаты были получены в отношении 7 из 8 детектируемых возбудителей, среди которых доминировали ПВ В19 (41,7%) и ВГЧ 6 т (36,1%). Следующую позицию в рейтинге выявления вирусных агентов заняли ЭВ, нуклеиновые кислоты которых присутствовали в тканях сердца у 5 пациентов из группы обследованных, что составило 13,9%. Далее следовали ВЭБ и АдВ (по 11,1%), ВЗВ и ЦМВ (по 2,77%). Генетический материал ВПГ 1 и 2 типов в исследованных образцах ЭМБ не был обнаружен (таблица 2).

Таблица 2 — Выявление генетического материала (нуклеиновых кислот) кардиотропных вирусов в тканях сердца (ЭМБ) пациентов ДКМП

| Вид материала | Кол-во позитивных результатов/процентное выявление НК | | | | | | | | Всего позитивных пациентов/ процентное выявление НК |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ВПГ | ВЗВ | ЦМВ | ВЭБ | ВГЧ 6 т | ПВ В19 | АдВ | ЭВ | |
| Ткани сердца (ЭМБ, n=36) | 0 | 1/2,77 | 1/2,77 | 4/11,1 | 13/36,1 | 15/41,7 | 4/11,1 | 5/13,9 | 27/75 |

Признаки моноинфекции выявлены в 51,9% вируспозитивных ЭМБ (14/27), в 48,1% (13/27) обнаружено смешанное инфицирование тканей сердца двумя и более вирусными патогенами. Вирусными возбудителями моноинфекций являлись ВГЧ 6 т (у 4 из 36 — 11,1%), ПВ В19 (5/36 — 13,9%), ЭВ (у 3 пациентов из 36 обследованных — 8,33%) и ВЭБ (2/36 — 5,55%).

При генетическом исследовании сывороток крови выявлено присутствие нуклеиновых кислот кардиотропных вирусов всего исследуемого спектра, общий уровень детекции вирусных генетических маркеров составил 14,1%. Среди обнаруженных вирусных патогенов доминировал ПВ В19 (5,93%), далее следовал ВЭБ (2,96%), геномы АдВ и ЦМВ выявлены с одинаковой частотой (2,22%) и в единичных случаях (по 0,74%) обнаружены нуклеиновые кислоты ВПГ, ВГЧ 6 т, ЭВ и ВЗВ (таблица 3).

Таблица 3 — Выявление генетических маркеров кардиотропных вирусных агентов в сыворотках крови пациентов с ДКМП и лиц контрольной группы

| Сыворотка крови | Кол-во позитивных результатов/процентное выявление НК | | | | | | | | Всего позитивных пациентов/ процентное выявление НК |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ВПГ | ВЗВ | ЦМВ | ВЭБ | ВГЧ 6 т | ПВ В19 | АдВ | ЭВ | |
| Основная группа (n=135) | 1/0,74 | 1/0,74 | 3/2,22 | 4/2,96 | 1/0,74 | 8/5,93 | 3/2,22 | 1/0,74 | 19/14,1 |
| Контрольная группа (n=30) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

В контрольной группе генетические маркеры вирусных инфекций не обнаружены. Различия в генетическом вирусологическом исследовании сывороток крови пациентов с клиническим диагнозом ДКМП (всего 135, из них позитивных — 19) и группы контроля (всего 30, из них позитивных — 0) были статистически достоверны по корректированному критерию $\chi 2$ (p=0,03) и по точному одностороннему методу Фишера (p=0,02).

В результате анализа данных вирусологического скрининга 135 пациентов с ДКМП в зависимости от длительности выявленного заболевания (давность болезни до 1,5 лет и длительность более 1,5 лет). Уровень выявления маркеров кардиотропных вирусов в группе с давностью заболевания до 1,5 лет значительно превысил уровень их детекции в группе с давностью ДКМП более 18 мес. Так, среди пациентов с меньшей длительностью болезни генетические маркеры ряда возбудителей вирусных инфекций были выявлены у 67,9% обследованных. В то же время у больных с регистрацией заболевания более 1,5 лет аналогичные маркеры определялись в 3 раза реже (20,7%). Разница в уровнях выявления маркеров кардиотропных вирусов оказалась статистически достоверной по корректированному критерию $\chi 2$ (p=0,003) и по точному одностороннему методу Фишера (p=0,005).

В результате комплексного вирусологического скрининга у пациентов с ДКМП выявлено 46 (34,1%) вируспозитивных результатов: по данным генетической диагностики образцов сыворотки крови (n=19) и по данным генетической диагностики ЭМБ образцов (n=27). Абсолютное первенство в вирусной ПЦР диагностике образцов крови и ЭМБ принадлежит ПВ В19 (35% от всех выявленных геномов), далее в рейтинге следуют ВГЧ6т (22%) и ВЭБ (12%) и по мере убывания — АдВ (11%), ЭВ (9%), ЦМВ (6%), ВЗВ (3%), ВПГ (2%). Частота выявления вирусных геномов у пациентов с ДКМП представлена на рисунке 1.

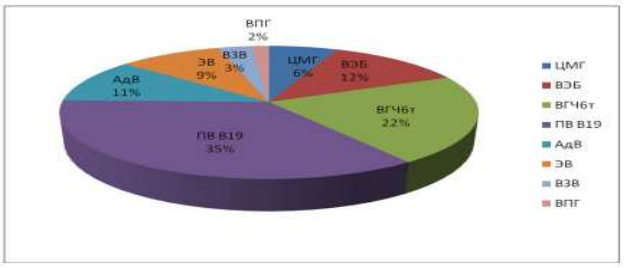



Рисунок 1 — Структура уровней выявления вирусных геномов в крови и ЭМБ пациентов с ДКМП

Отмечаются некоторые особенности уровней детекции вирусных геномов в биологических образцах тканей: если парвовирус В19 выявлен, примерно, с одинаковой частотой в крови и в ЭМБ, то нуклеиновые кислоты ВГЧ6 обнаружены, преимущественно, в биоптатах миокарда (рисунок 2).

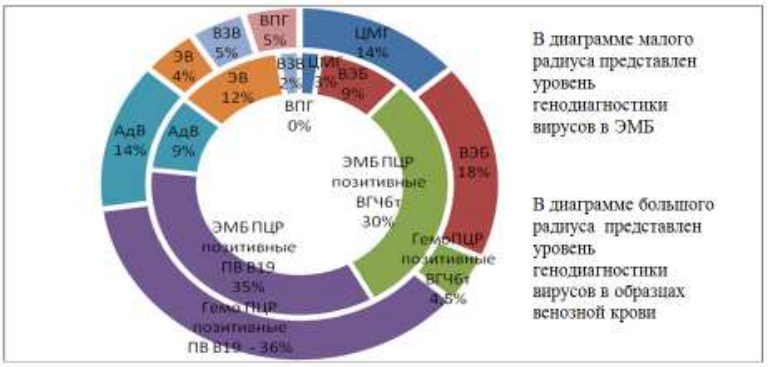



Рисунок 2 — Сравнительная структура выявления вирусных геномов в биологических тканях пациентов с ДКМП

При сравнительной оценке клинических и инструментальных данных вируспозитивных и вируснегативных пациентов достоверных различий не выявлено по анамнестическим данным (ранее перенесенная ОРВИ, p=0,104), по наличию нарушений сердечного ритма и проводимости (фибрилляция/трепетание предсердий, p=0,77; желудочковые тахиаритмии, p=0,62; полная блокада левой ножки пучка Гиса, p=0,75) и по ФК сердечной недостаточности по NYHA (p=0,23). Достоверно отличались лишь сроки давности выявления заболевания: вируспозитивные пациенты имели меньшую длительность болезни — в среднем 18,2±9,39 против 38,2±12,9 мес. от момента выявления ДКМП в группе вируснегативных больных (p=0,000). При анализе ЭхоКГ данных у пациентов с ДКМП нами выявлены достоверные различия негативного ремоделирования правого желудочка: в группе вируспозитивных пациентов конечные объемы правого желудочка (КДО ПЖ и КСО ПЖ, соответственно, с p=0,005 и p=0,029) значительно превышали эти показатели в группе вируснегативных ДКМП; систолическое давление в системе легочной артерии (ДЛА сист) также достоверно отличалось (p=0,041) от уровня ДЛА в группе вируснегативных больных. Результаты анализа Манна–Уитни представлены в таблице 4.

Таким образом, наиболее выраженные признаки негативного ремоделирования правых отделов сердца выявлены в группе вируспозитивных пациентов с ДКМП. При проведении корреляционного анализа Спирмена коэффициенты корреляции между двумя признаками — вируспозитивностью и объемными параметрами правого желудочка составили соответственно r=0,66 (p=0,006) — для КДО ПЖ и r=0,69 (p= 0,005) — для КСО ПЖ.

Результаты проведенных нами исследований находятся в соответствии с данными немецких ученых, полученными в результате ПЦР анализа эндомиокардиальных биоптатов (ЭМБ) 245 пациентов с идиопатической формой ДКМП (Charite Hospital, Berlin), согласно которым генетический материал широкого ряда вирусов был выявлен у 67,4% пациентов. В 27,3% случаев наблюдались пациенты с многочисленными инфекциями. В спектре выявленных вирусных ДНК в ЭМБ доминировали нуклеиновые кислоты ПВ В19 и ВГЧ6т [11]. В другом крупном исследовании в Германии (University Hospital of Tübingen) ПВ В19 был выявлен в биоптатах у 176 пациентов с ДКМП (35,3%)

и у 322 из 498 пациентов с миокардитами (64,7%), в сравнении с биоптатами здоровых добровольцев, у которых генетические вирусные маркеры были обнаружены в 7 случаев из 91 (7,7%), уровень достоверных различий составил p<0,01 [12].

Таблица 4 — Результаты теста Манна-Уитни с уровнем значимой достоверности p<0,05 при сравнительной характеристике клинико-гемодинамических и лабораторных параметров вируспозивных и вируснегативных больных ДКМП

| Параметры, ед. | Вируспозитивные | Вируснегативные | U | Z | P-уровень |
|---|---|---|---|---|---|
| ПикVO2, мл\кг\мин | 186,5 | 138,5 | 66,5 | -0,472 | 0,637 |
| КДО ЛЖ, мл | 4929,0 | 2211,0 | 1470,0 | 0,393 | 0,694 |
| КСО ЛЖ, мл | 4774,5 | 2246,5 | 1505,5 | 0,084 | 0,933 |
| ФВ ЛЖ,% | 5025,5 | 2234,5 | 1454,5 | 0,700 | 0,484 |
| КДО ПЖ, мл | 2592,0 | 1686,0 | 576,0 | -2,836 | 0,005 |
| КСО ПЖ, мл | 2669,5 | 1608,5 | 653,5 | -2,185 | 0,029 |
| ФВ ПЖ,% | 3130,5 | 1429,5 | 964,5 | 0,084 | 0,933 |
| ДЛАсист,, мм рт. ст. | 3953,5 | 2487,5 | 1103,5 | -1,954 | 0,041 |

Однако нельзя не учитывать и ошеломляющие результаты другой группы ученых (University of Dresden) по изучению ПВ В19 и разновидности парвовируса — человеческого бокавируса (БоВЧ) в предсердных биоптатах пациентов, не страдающих миокардитом и ДКМП. В нозологии исследуемой группы больных в 65% доминировала коронарная патология (забор биоптатов проводился во время операции аорто-коронарного шунтирования), а в 35% — клапанная патология (забор биоптатов проводился при хирургической клапанной коррекции). Из 100 пациентов у 85% обнаружены ДНК ПВ В19 в тканях предсердий, а у 5% больных в предсердных биоптатах выявлены ДНК БоВЧ. Признаки парвовирусной В19 виремии (ДНК вируса в крови пациентов) наблюдались в 4% случаев [13].

Так какова же роль ПВ В19? Является ли парвовирус В19 основным этиопатогенетическим фактором ДКМП или это «свидетель» заболевания пациента? Необходимо ли проводить активную противовирусную терапию, добиваясь элиминации парвовируса?

Известно, что далеко не у всех больных, страдающих вирусным миокардитом, в дальнейшем развивается ДКМП [14]. Примером этого могут быть результаты длительного наблюдения за больными, перенесшими вирусный миокардит. Развитие ДКМП наблюдается у 3–3,5% больных с миокардитом [14,15]. Естественно, возникает вопрос, почему прогноз миокардита столь различен. Наиболее логичным объяснением, которое приводится в литературе, является наличие генетически детерминированных нарушений иммунного ответа. Повреждение вирусом является лишь пусковым механизмом сложной цепи патологических процессов, приводящих к ДКМП. Вирусная инфекция может инициировать синтез антител к депрессорным клеткам, повысить активность Т- и В-клеток, выработку антител и цитокинов. После поражения сердца вирус может исчезнуть, запустив аутоиммунный процесс, приводящий к возникновению ДКМП [15].

**Выводы.** Полученные нами и представленные выше результаты демонстрируют высокую частоту выявления вирусных генетических маркеров у пациентов с ДКМП. Присутствие вирусных геномов в 75% эндомиокардиальных биоптатов и детекция виремии у 14,1% пациентов с ДКМП является, с нашей точки зрения, хорошей доказательной базой в пользу предполагаемой роли кардиотропных вирусов, как возможных этиопатогенетических факторов развития ДКМП. Подтверждением этому являются результаты корреляционного анализа клинико-гемодинамических параметров вируспозитивных и вируснегативных пациентов с ДКМП. Достоверно более выраженные признаки негативного ремоделирования сердца (увеличение объемных параметров правого желудочка, увеличение ДЛАсист) выявлены в группе вируспозитивных пациентов. Коэффициенты корреляции между двумя признаками (вируспозитивностью и негативным ремоделированием правого желудочка) составили соответственно r=0,66 (p=0,006) — для КДО ПЖ и r=0,69 (p=0,005) — для КСО ПЖ.

**Литература**

1. Sinagra, G. The classification of cardiomyopathies / G. Sinagra, L. Mestroni, F. Camerini // Cardiomyopathies. — 1999. — Vol. 6. — P. 3–8.

2. Kawai, C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death in learning from the past for the future / C. Kawai // Circulation. — 1999. — Vol. 99. — P. 1091–2000.

3. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction / U. Kuhl [et al.] // Circulation. — 2005. — Vol. 112, № 13. — P. 1965–1970.

4. ,Molecular detection and differentiation of enteroviruses in endomyocardial biopsies and pericardial effusions from dilated cardiomyopathy and myocarditis / S. Fujioka [et al.] // Am. Heart. J. — 1996. — Vol. 131. — P. 760–765.

5. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction / U. Ku¨hl [et al.] // Circulation. — 2005. — Vol. 111. — P. 887–893.

6. Trace element changes in the myocardium during coxsackievirus B3 myocarditis in the mouse / E. Funseth [et al.]// Biol. Trace Elem. Res. — 2000. — Vol. 76. — P. 149–160.

7. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy / U. Kuhl [et al.]// J. Med. Virol. — 2008. — Vol. 80. — P. 1243–1251.

8., Leveque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis / L. Andreoletti [et al.] // Arch. Cardiovasc. Dis. — 2009. — Vol. 102, № 6–7. — P. 559–568.

9. A myocarditis outbreak with fatal cases associated with adenovirus subgenera C among children from Havana City in 2005 MG / C. Savón [et al.] // J. Clin. Virol. — 2005. — Vol. 43. — P. 152–157.

10. First report on fatal myocarditis associated with adenovirus infection in Cuba / O. Valdés [et al.] // J. Med. Virol. — 2008. — Vol. 80. — P. 1756–1761.

11. Detection of viral genome in the myocardium: lack of prognostic and functional relevance in patients with acute dilated cardiomyopathy / F. Kuethe [et al.] // Am. Heart J. — 2007. — Vol. 153. — P. 850–858.

12. Bock, C.-T. Parvovirus B19 viral and postviral myocarditis are the major causes of acute and chronic dilated cardiomyopathy / C.-T. Bock, K. Klingel, R. Kandolf // N. Engl. J. Med. — 2010. — Vol. 362, № 13. — P. 1249–1256.

13. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis / F. Kuethe [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 49, № 11. — P. 1660–1666.

14. Myocarditis as a precipitating factor for heart failure: evaluation and 1-year follow-up using cardiovascular magnetic resonance and endomyocardial biopsy S.Mavrogeni [et al.] // Eur. J. Heart Failure. — 2011. — Vol. 13. – P. 830–837.

15. The management of myocarditis / H.-P. Schultheiss [et al.] // Eur. Heart J. — 2011. — Vol. 32. — P. 2616–2625.

## PARVOVIRUS B19 THIS IS ESSENTIAL ETIOPATHOGENIC FACTOR OF DILATED CARDIOMYOPATHY TODAY OR «WITNESSES» OF THIS DISEASE?

**Vaikhanskaya T.G.[1], Guel L.M.[1], Shumovetc V.V.[1], Sevrukevich V.I.[1], Bohush Z.F.[2], Amvrosieva T.V. [2]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Cardiology;*

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

This article presents the range of occurrence cardiotropic viruses (enteroviruses, Epstein–Barr virus, varicella-zoster virus, parvovirus B19, adenoviruses, herpes simplex virus, human herpesvirus 6, cytomegalovirus) in patients with dilated cardiomyopathy (DCM) and influence these pathogens on clinical prognosis. The level of detection markers of the viral agents was identified 34.1% in patients with this disorder. The nucleic acids of viral pathogens were determined in heart tissue of 75% of samples. Among the wide range of viruses most often were detected parvovirus B19 and human herpes virus type 6.

**Keywords:** dilated cardiomyopathy (DCM), cardiotropic viruses, nucleic acid (NA).

Поступила 04.09.2013

## ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ, ОСНОВАННЫХ НА МЕТОДЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА, НА ПРИМЕРЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК ЛАССА, МАРБУРГ И ЭБОЛА

**Владыко А.С., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Фомина Е.Г.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Приводятся результаты исследований по адаптации метода иммуноферментного анализа, предназначенного для выявления антител к особо опасным вирусным тропическим лихорад-

кам Ласса, Марбург и Эбола в сыворотках крови пациентов. В результате разработан коммерческий вариант тест-системы и получено разрешение на серийный выпуск (рег. удостоверение № ИМ-7.99748, ТУ BY 100558032.200-2012).

**Ключевые слова:** иммуноферментный анализ, антитела, вирусы Ласса, Марбург, Эбола.

**Введение.** Исходя из разработок зарубежных авторов [1, 2, 3] и результатов собственных исследований [4, 5], касающихся антигенного картирования (пептосканирования) структурных и неструктурных полипептидов возбудителей вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, было сделано предположение, что у разных патогенов имеются общие отдельные антигенные детерминанты, которые могут индуцировать в организме гуморальный иммунный ответ, оцениваемый серологическими и молекулярно-биологическими диагностическими методами как ложноположительные или неспецифические результаты. На самом деле речь идет о перекрестных реакциях. В дальнейшем это предположение было многократно подтверждено в нашей лаборатории при разработке и внедрении иммунобиологических препаратов, основанных на иммуноферментном и иммунофлуоресцентном методах. Правильная и грамотная интерпретация этого положения, основанная на современных достижениях в области протеомики и биоинформатики, будет способствовать дальнейшему совершенствованию такого рода диагностических тест-систем. Имеются в виду основные качественные и количественные параметры, предъявляемые к этим методам — чувствительность и специфичность.

Мнение ряда специалистов, делающих вывод о том, что данные методы диагностики устарели и не имеют перспективы — ошибочны. Дело в том, что с целью повышения чувствительности иммуноферментного анализа в последние годы стало модным увлекаться внедрением разных способов мечения антител (или антигенов), а также включением других меток, дающих более сильный сигнал. Это происходит ввиду того, что специалисты-физики в погоне за сильной меткой высокопрофессионально решают задачу по конъюгации, т. е. введению метки (наночастиц, высокоактивных ферментов, лантаноидов и т. д.) для создания конъюгата. Реализация такого алгоритма приводит, как правило, к еще большей «неспецифике» — ложноположительным или ложноотрицательным результатам. При этом почему-то совершенно забывают об основном и главном критерии — специфичности. Поэтому в данном случае необходимо в первую очередь решать задачу «ключ-замок» — насколько антитела подходят к антигену, а затем увлекаться второстепенными делами или хотя бы параллельно решать проблему антиген-антительного взаимодействия — критичного в этой ситуации параметра.

В этом плане интересной представляется наша попытка по разработке метода лабораторного подтверждения наличия специфических антител к возбудителям особо опасных вирусных геморрагических лихорадок Ласса, Марбург и Эбола в сыворотках крови пациентов с помощью метода иммуноферментного анализа. В чем проблема? Первое, нужно ли вообще разрабатывать диагностические тесты к тропическим особо опасным инфекциям, экзотическим для нашей страны? В настоящее время данный вопрос не обсуждается, т. к. во-первых, речь идет о возможности случайного или преднамеренного заноса. Во-вторых, потепление климата — отсюда вероятность появления тропической экзотики. Главное — необходимость иметь в стране лаборатории, владеющие технологиями (биотехнологиями), обеспечивающими биологическую безопасность страны.

В настоящее время для развитых стран, где созданы условия для существования современных лабораторий, проблем по разработке любых диагностических тест-систем не существует. Даже если возникнет необходимость создания иммунобиологической тест-системы к возбудителю натуральной оспы, возбудители которой законсервированы в двух лабораториях мира — бывшем СССР (сейчас Россия) и США — иммунобиологическую (например, иммуноферментную) тест-систему для выявления специфических антигенов и антител создать особого труда не представляет.

Задачи такого плана успешно решались за последние 15 лет в нашей лаборатории. Для этого широко использовались, как сейчас принято считать, достижения в области геномики и протеомики, или биоинформатики.

**Целью** настоящего исследования явилась адаптация метода иммуноферментного анализа для выявления специфических антител к возбудителям особо опасных инфекций Ласса, Марбург и Эбола в сыворотках крови пациентов. Конечная цель — разработка коммерческой тест-системы, предназначенной для выявления антител к данным возбудителям.

**Материалы и методы.** Возбудители как матрица РНК для получения рекомбинантных белков — антигенов. В данном конкретном случае нам повезло частично. В лаборатории имелись особо опасные вирусы, но не все штаммы, циркулирующие в природе. В качестве антигенов для сенсибилизации 96-луночных панелей использовали рекомбинантные пептиды, полученные экспрессией антиген-значимых участков нуклеокапсидных белков вирусов Ласса, Марбург и Эбола по описанной ранее методике [6].

***Антитела.*** Сыворотки для анализа в количестве около 600 образцов были получены от здоровых пациентов, проживающих в Гвинейской народной республике, и любезно предоставлены профессором Лукашевичем И.С. Постановку метода иммуноферментного анализа проводили по приведенной схеме [7] с адаптацией отдельных этапов постановки под «липкие» сыворотки африканских пациентов [8]. Постановку иммунного блоттинга проводили по методу Towbin [9].

**Результаты и их обсуждение.** Обычно при разработке иммуноферментных тест-систем исследования начинают, когда есть в наличии нужные референс-антигены и референс-антитела к ним. Если с референс-антигенами в нашем случае задача решалась без особых проблем (использовали международную базу данных), то с референс-антителами задача решалась со специфическими особенностями. Во-первых, в качестве положительного контроля в ИФА тест-системах обычно используются заведомо положительные сыворотки, протестированные коммерческой тест-системой и выделенные от больных с явными клиническими проявлениями и к тому же в эндемичных регионах. В белорусском регионе ожидать появления пациентов с диагнозом сразу трех особо опасных инфекций возможно только теоретически. Во-вторых, эндемичными по лихорадкам Ласса, Марбург и Эбола являются разные регионы африканского континента — это страны Западной и Центральной Африки. Вспышки заболеваний данными лихорадками по срокам разнятся между собой. Для получения сывороток из этих очагов нужно решать много разноплановых проблем, начиная от самой несложной — организация и финансирование командировок — до необходимости решать социально-политические аспекты.

Ранее нами было установлено, что сыворотки пациентов, переболевших малярией, а также другими инфекциями, содержат клоны антител, специфически реагирующие с возбудителями тропических геморрагических лихорадок Ласса, Марбург, Эбола и СПИДа [4, 5]. Донорами антител в данном случае оказались специалисты, вернувшиеся в СССР из командировки в страны Африки и заболевшие малярией, а также референс-сыворотки, полученные к возбудителям инфекций из разных семейств вирусов.

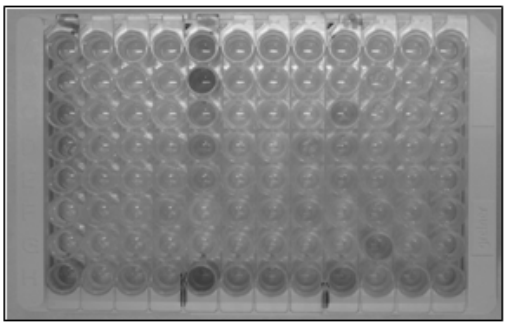
В данном сообщении в качестве источника антител послужили сыворотки здорового населения, проживающего в Африке, где заболеваемость малярией приближается к 100%. Всего было обследовано 457 сывороток жителей Гвинейской народной республики. При этом сыворотки были собраны у пациентов, проживающих в разных ландшафтных зонах, расположенных по всей территории страны. Особенностью сывороток африканских пациентов оказалось то, что в серологических реакциях они за счет белок-белковых взаимодействий чаще и в большей степени реагировали неспецифически. Из-за этой особенности у зарубежных специалистов они считаются «липкими». Сказывается, по-видимому, большее разнообразие представителей флоры и фауны по сравнению со средними широтами. В связи с этим при постановке иммуноферментного метода (в процессе его оптимизации) приходилось использовать разные приемы для снижения ненужных реакций — манипулировать с отмывками, при учете вводить более высокий уровень cut offи т.д.

Кроме этого, важным элементом оказалось отобрать сыворотки, которые реагировали бы либо со всеми тремя антигенами — рекомбинантными полипептидами вирусов Ласса, Марбург, Эбола, либо только с одним полипептидом, поскольку задача состояла в получении в конечном итоге поливалентной с моновалентным подтверждением тест-системы. В результате скрининговых исследований, выполненных с использованием в качестве твердой фазы рекомбинантных антигенов, разведений сывороток 1:100 и антивидового коньюгата к IgG человека, оказалось, что подавляющее большинство исследованных сывороток (около 70%) содержали антитела к двум антигенам. При этом сыворотки, содержащие пары клонов антител Ласса–Марбург, Марбург–Эбола и Ласса–Эбола, распределялись равномерно.

Сыворотки, содержащие клоны антител сразу к трем антигенам, и моноспецифические распределились следующим образом: к трем антигенам выявлено три сыворотки (0,7%), к рекомби-

нантным полипептидам вируса Ласса — 6 сывороток (1,3%), вируса Марбург — 11 сывороток (2,4%) и вируса Эбола — 5 сывороток (1,1%). Типичная картина при постановке ТИФА представлена на рисунке 1.

Антигены:
Ласса Марбург Эбола



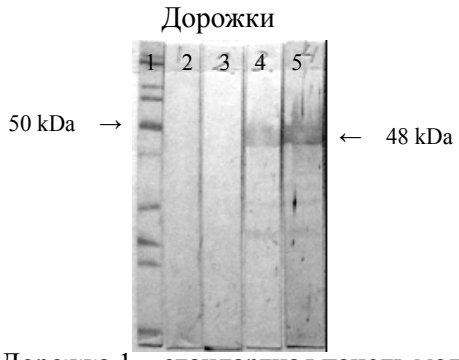
Нижний ряд лунок: 1, 5 и 9-я — сыворотка № 12.01.06 (К+);
Второй ряд снизу: лунки №№ 1, 5, 9 — отрицательная сыворотка (К-);
Третий ряд снизу: лунки №№ 1, 5, 9 — контроль конъюгата.
Антигены при сенсибилизации вносились в лунки по вертикали по 4 ряда каждый.
Рисунок 1 — Визуальный учет результатов скрининга сывороток африканских пациентов до внесения стоп-раствора

Одни и те же сыворотки пациентов, внесенные в лунки с разными антигенами, прореагировали с разной оптической плотностью. Например, одна и та же сыворотка, внесенная в 2, 6 и 10-ю лунки второго ряда снизу на антигены соответственно Ласса, Марбург и Эбола, дала положительный результат только с рекомбинантным полипептидом вируса Эбола. Преимущественно с антигеном вируса Марбург сработала сыворотка, внесенная в 7-й ряд снизу (5-я лунка).

После внесения стоп-раствора панель учитывалась спектрофотометрически при длине волны 450 нм. В данном случае оптическая плотность (ОП) образцов сывороток варьировала в случае положительного результата от 0,5 до 2,3 единиц ОП, тогда как в отрицательных сыворотках ОП была равна примерно 0,2 единицы. Контроль конъюгата соответствовал значению ОП, равному меньше 0,1 единицы.

В конечном итоге из положительных поливалентных (к трем антигенам) и положительных моновалентных сывороток была сформирована стандартная панель сывороток, которая была использована для подтверждения их специфичности методом иммунного блоттинга. На рисунке 2 приведены типичные результаты данных исследований на примере рекомбинантного белка вируса Марбург и сыворотки, отобранной по результатам скрининга в иммуноферментном тесте как содержащая антитела к данному вирусу. Видно, что при исследовании референс-сыворотки к вирусу Марбург (дорожка 5) и сыворотки к вирусу Марбург, полученной у пациента из Африки (дорожка 4), обнаруживается полоса взаимодействия в области 48 кДа, что свидетельствует о специфичности исследуемой пробы. Тогда как сыворотки к вирусам Ласса (дорожка 2) и сыворотка к вирусу ГЛПС (дорожка 3) оказались отрицательными по специфичности в данном тесте.

Исходя из полученных положительных результатов при тестировании сывороток африканских пациентов методом иммуноферментного анализа на наличие антител к рекомбинантным белкам вирусов Ласса, Марбург и Эбола и подтверждением их специфичности методом иммунного блоттинга, была разработана и зарегистрирована в Республике Беларусь диагностическая тест-система (рисунок 3), предназначенная для лабораторного подтверждения и сероэпидемиологического анализа обстановки по лихорадкам Ласса, Марбург и Эбола в предполагаемых очагах на неэндемичных и эндемичных территориях (рег. удостоверение № ИМ-7.99748, ТУ BY 100558032.200-2012).




Дорожка 1 – стандартная панель молекулярных масс белков; дорожка 2 — сыворотка к вирусу Ласса; 3 — сыворотка к вирусу ГЛПС; 4 — референс-сыворотка к вирусу Марбург; 5 — сыворотка после тестирования в иммуноферментном тесте.

Рисунок 2 — Результаты анализа сыворотки пациента из Гвинейской народной республики методом иммунного блоттинга на антитела к вирусу Марбург

Рисунок 3 — Внешний вид и содержимое иммуноферментной диагностической тест-системы, предназначенной для выявления антител в сыворотках крови пациентов к возбудителям особо опасных вирусных геморрагических лихорадок Ласса, Марбург и Эбола

**Выводы.** Проведены исследования по разработке иммуноферментной тест-системы, предназначенной для выявления антител к особо опасным вирусам Ласса, Марбург и Эбола. В качестве антигенов были использованы рекомбинантные полипептиды данных возбудителей. В качестве антител были использованы сыворотки здорового населения Гвинейской народной республики (Западная Африка). В результате была разработана и зарегистрирована в Республике Беларусь диагностическая тест-система, предназначенная для лабораторного подтверждения диагноза и сероэпидемиологического анализа обстановки по лихорадкам Ласса, Марбург и Эбола в неэндемичных и эндемичных регионах (рег. удостоверение № ИМ-7.99748, ТУ BY 100558032.200-2012).

Авторы выражают глубокую благодарность бывшему руководителю отдела особо опасных инфекций профессору И.С. Лукашевичу за предоставление сывороток крови для анализа.

**Литература**

1. Cox, F.E.G. The worm and the virus / F.E.G. Cox // Nature. — 1990. — Vol. 347. — P. 618.

2. Immunological crossreactivity between the human immunodeficiency virus type 1 virion infectivity factor and a 170 kD surface antigen of Shistosoma mansoni / J. Khalife [et al.] // J. Exp. Med. — 1990. — Vol. 172. — P. 1001–1004.

3. Ng, V.L. Serological diagnosis with recombinant peptides/proteins / V.L. Ng // Clin. Chem. — 1991. — Vol. 37, № 10. — P. 1667–1668.

4. Malaria patients serum cross-reacts with Lassa, Marburg and Ebola viruses A.S. Vladyko [et al.] // 8th Int. Congr. Immunol., Budapest, Hungary, Aug. 23–28, 1992. — Budapest, 1992. — W. 83.

5. Ложноположительные реакции при лабораторной диагностике вирусных геморрагических лихорадок Ласса, Марбург, Эбола и СПИДа / А.С. Владыко [и др.] // Вопр. вирусол. — 1997. — № 2. — С. 66–70.

6. Фомина, Е.Г. Конструкция рекомбинантных экспрессирующих плазмид / Е.Г. Фомина, А.С. Владыко // Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология, клиника): материалы II науч.-практ. конф. по итогам выполнения ГНТП «Инфекционные болезни», 1998–2000, Минск, 18 янв. 2001. — Минск, 2001, — С.128–129.

7. Владыко, А.С. Разработка иммуноферментной тест-системы для серодиагностики ЛХМ на основе использования рекомбинантного антигена / А.С. Владыко, И.К. Фомин, В.Н. Зайцева // Достижения мед. науки Беларуси. — Минск: БелЦНМИ, 1999. — Вып. IV. — С. 55–59.

8. Серологические доказательства существования очагов циркуляции вируса Ласса в Гвинейской республике / И.С. Лукашевич [и др.] // Вопр. вирусол. — 1993. — № 1. — С.24–28.

9. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76, № 9. — P. 4350–4354.

## FEATURES OF THE DEVELOPMENT AND USE OF IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTIC TESTS BASED ON THE METHOD OF THE IMMUNE-ENZYME ANALYSIS AT THE DIAGNOSIS OF DANGEROUS VIRAL HAEMORRHAGIC FEVERS LASSA, MARBURG AND EBOLA

**Vladyko A.S., Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Shkolina T.V., Fomina E.G.**

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

The results of studies on the adaptation of the method of enzyme immunoassay for the detection of antibodies to the highly dangerous virus of tropical fevers Lassa, Marburg and Ebola are demonstrated. As a result of a commercial version of the test system was produced.

**Keywords:** immune-enzyme analysis, detection of antibodies, Ebola, Lassa, Marburg viruses.

Поступила 06.09.2013

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЗАИМОСВЯЗЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ/ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS* К АНТИБИОТИКАМ И ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

**Гаврилова И.А.[1], Титов Л.П.[2]**

[1]*Белорусский государственный медицинский университет;*

[2]*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Дезинфицирующие средства, в отличие от антибиотиков, не имеют специфической мишени действия в бактериальной клетке. Однако появляющиеся сообщения о формировании резистентности к антибиотикам у бактериальных культур, выращенных в присутствии заниженных концентраций биоцидов, ставят на обсуждение вопрос о возможной взаимосвязи показателей устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам, наличии общих сайтов приложения их бактерицидного действия и, как следствие, схожих закономерностей возникновения резистентности. В данном исследовании изучены показатели чувствительности/устойчивости к дезинфектантам и антибиотикам клинических изолятов бактерий рода *Staphylococcus* и проведен анализ взаимосвязи этих показателей.

**Ключевые слова:** мониторинг антибиотикорезистентности, устойчивость к дезинфектантам, стафилококки.

**Введение.** Всемирная организация здравоохранения признает борьбу с устойчивостью к противомикробным препаратам одной из приоритетных проблем современного здравоохранения [1]. Формирование и распространение в стационарах устойчивых к антимикробным препаратам (в т. ч. к дезинфицирующим средствам) вариантов бактерий является основными причинами вспышек нозокомиальных инфекций [2, 3]. Осуществление мониторинга резистентности к антибактериальным средствам клинически значимых микроорганизмов — неотъемлемое звено системы инфекционного контроля во всех странах, где реализуется стратегия по сдерживанию распространения резистентности микробов к антибактериальным средствам [1, 4, 5].

По данным исследований последних лет, бактерии рода *Staphylococcus* являются одними из доминирующих патогенов в этиологической структуре внутрибольничных инфекций [2, 4, 6]. Вместе с тем, широкое, и часто бесконтрольное, использование антимикробных препаратов в медицинской практике способствует возникновению генетически измененных устойчивых вариантов бактерий [3, 7–9].

В последние годы к проблеме возникновения и распространения устойчивых форм бактерий в условиях стационара добавилась обеспокоенность медицинской общественности появляющимися сообщениями о возможной «тренировке» бактерий суббиоцидными концентрациями дезинфектатов, которая может привести как к селекции дезрезистентных мутантов, так и к появлению сниженной чувствительности к ряду антибиотиков и возможность возникновения сочетанной резистентности к дезинфектантам и антибиотикам [2, 9–11].

В связи с этим актуальным становится установление влияния дезинфектантов и антибиотиков на одни и те же популяции бактерий, а также установление взаимосвязи устойчивости к дезинфектантам и антибиотикорезистентности на фенотипическом и генотипическом уровнях.

**Целью** данного исследования является изучение частоты фенотипической чувствительности/устойчивости к дезинфектантам и антибиотикам клинических изолятов бактерий рода *Staphylococcus* и установление характера взаимосвязей между этими показателями.

**Материалы и методы.** ***Микроорганизмы и их культивирование.*** Был изучен 51 штамм стафилококков, из них 39 штаммов золотистого стафилококка и 12 штаммов коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных от пациентов стационаров с гнойно-септическими инфекциями, а также с объектов внешней среды стационаров хирургического профиля города Минска.

Материал от пациентов с гнойно-септическими инфекциями забирали желатиновыми тампонами и осуществляли количественный посев на чашки с плотными питательными средами (желточно-солевой агар, мясопептонный агар, кровяной агар) для выделения стафилококков. Забор материала с объектов больничной среды проводили стерильным тампоном в 1 мл мясо-пептонного бульона с глюкозой и, после инкубации в термостате, засевали на чашки с плотными питательными средами. Идентификацию выделенных культур проводили по ключам и схемам, указанным в определителе бактерий Берджи [12].

***Устойчивость бактерий к противомикробным препаратам.*** Для исследования активности дезинфектантов и чувствительности/устойчивости к ним бактерий использовался стандартный качественный суспензионный метод [13]. Изучение устойчивости проводилось в отношении пяти дезинфектантов различных химических групп, зарегистрированных в Республике Беларусь; коммерческие названия дезинфицирующих средств закодированы под номерами: № 1 — дезинфектант из группы спиртов (действующие вещества — пропанол и четвертичное аммониевое соединение (ЧАС)); № 2 — хлорсодержащий (дихлоризоциануровая кислота); № 3 — композиционный (ЧАС + полигексаметиленгуанидин (ПГМГ)); № 4 — на основе полигуанидинов; № 5 — на основе глутарового альдегида.

Данные препараты отличаются по механизму активности и воздействуют на различные компоненты бактериальной клетки. Рабочая концентрация и экспозиция дезинфицирующего средства соответствовала указанным в инструкции производителя.

Резистентные к дезинфектантам культуры исследовали на антибиотикоустойчивость. Определение чувствительности/устойчивости к антибиотикам проводилось с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek. Анализировалась устойчивость к 9 антибиотикам, используемым в терапии инфекций, возбудителями которых являются стафилококки (пенициллин, оксациллин, гентамицин, ципрофлоксацин, тобрамицин, эритромицин, клиндамицин, тетрациклин, рифампицин)

***Статистические методы.*** Ввод, статистическую обработку и анализ данных производили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel версия 7.0 и Статистика версия 6.0. Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Достоверность различий между статистическими параметрами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ с целью изучения связи между чувствительностью/устойчивостью к антибиотикам и дезинфектантам проведен с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

**Результаты и их обсуждение.**

***1. Чувствительность/устойчивость к дезинфектантам клинических изолятов бактерий рода Staphylococcus (таблица 1).*** Среди стафилококков самый высокий уровень резистентности выявлен к дезинфектанту №3 на основе четвертичных аммониевых соединений. Из 51 исследованного штамма 23 штамма (45,1±5,9%, $p<0,05$) оказались устойчивыми к ЧАС. При анализе чувствительности к препарату № 4 (группа гуанидинов) выявлено 14 резистентных штаммов из 51 (27,5±4,9%). 3 штамма (5,9%) оказались устойчивы к дезинфектанту на основе пропанола. К №№2 и 5 были устойчивы по 2 штамма из 51 (3,9%).

Таблица 1 — Характеристика чувствительности/устойчивости клинических изолятов бактерий рода *Staphylococcus* к дезинфектантам

| Исследованные дезинфектанты (АДВ*) | Удельный вес устойчивых и чувствительных к дезинфектанту штаммов стафилококков, (% ± m) | |
|---|---|---|
| | устойчивые | чувствительные |
| № 1 (пропанол+ЧАС) | 5,9±2,4 | 94,1±7,0 |
| № 2 (дихлоризоциануровая кислота) | 3,9±2,0 | 60,8±7,0 |
| № 3 (ЧАС + полигуанидин) | 45,1±5,9 | 54,9±6,3 |
| № 4 (полигексаметиленгуанидин) | 27,5±4,9 | 72,5±7,8 |
| № 5 (глутаровый альдегид) | 3,9±2,0 | 96,1±7,0 |

Примечание. * АДВ — активно действующее вещество.

Наибольшей устойчивостью к дезинфицирующим средствам характеризовались изоляты золотистого стафилококка. Они обладали устойчивостью к дезинфектантам всех исследованных химических групп. Среди коагулазоотрицательных стафилококков выявлены штаммы устойчивые к препаратам дезинфектантов №№ 3 и 4 и отсутствовали резистентные изоляты к хлор-, спирто- и альдегидсодержащим дезинфектантам.

Стафилококки, обладающие повышенным уровнем резистентности к дезинфектантам (к 2–3 препаратам одновременно) составили 23,5±4,55% от общего числа исследованных штаммов. 66,7% полирезистентных штаммов были выделены с объектов внешней среды стационаров, и только 33,3% были выделены от пациентов. Следует отметить, что 100% штаммов обладающих повышенной резистентностью были одновременно устойчивы к дезинфектантам на основе гуанидина и комбинации гуанидины + ЧАС.

***2. Фенотипическая чувствительность/резистентность к антибиотикам у изолятов стафилококков, устойчивых к дезинфектантам.*** Исследование антибиотикорезистентности стафилококков позволило выявить высокий удельный вес полирезистентных культур (таблица 2).

Таблица 2 — Фенотипическая резистентность к антибиотикам клинических изолятов стафилококков, устойчивых к дезинфектантам

| Антибиотик | Удельный вес устойчивых (R), умеренно устойчивых (I) и чувствительных (S) к антибиотику штаммов среди стафилококков с дезрезистентностью, (% ± m) | | |
|---|---|---|---|
| | R | I | S |
| бензилпенициллин | 97,4±7,8 | – | 2,6±1,6 |
| оксациллин | 47,4±6,5 | – | 52,6±6,5 |
| гентамицин | 18,4 ±4,1 | 7,9 ±2,8 | 73,7 ±7,3 |
| тобрамицин | 15,8 ±3,9 | 5,3 ±2,3 | 78,9 ±7,4 |
| ципрофлоксацин | 13,2 ±3,5 | 2,6 ±1,6 | 84,2 ±7,6 |
| эритромицин | 55,3 ±6,6 | – | 44,7 ±6,1 |
| клиндамицин | 57,9 ±6,7 | – | 42,1 ±5,9 |
| тетрациклин | 21,1 ±4,4 | – | 78,9 ±7,4 |
| рифампицин | 7,9 ±2,8 | – | 92,1 ±7,7 |

Среди изолятов *S.aureus* 42,3±6,2% штаммов, устойчивых к дезинфектантам, обладали устойчивостью и/или промежуточной устойчивостью к 2 и более антибиотикам. 88,5±8% штаммов золотистого стафилококка были устойчивы к пенициллинам, 50,0% — к клиндамицину, 42,3% — к эритромицину, 21,2% устойчивы и умеренно устойчивы к аминогликозидам. Устойчивость к тетрациклину была выявлена у 26,9% штаммов *S.aureus*. Чувствительностью к ципрофлоксацину обладали 84,6% штаммов *S.aureus* устойчивых к дезинфектантам. Промежуточная устойчивость к данному антибиотику была выявлена у 3,8%, а 11,5% штаммов золотистого стафилококка с признаком дезрезистентности обладали устойчивостью к ципрофлоксацину. К рифампицину были устойчивы 7,7% исследованных штаммов *S.aureus* (рисунок 1).

Среди коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) полирезистентные штаммы составили 83,3±8,7%. Среди устойчивых к какому-либо дезинфектанту устойчивость к пенициллинам проявили 75±8,3% из них. При оценке устойчивости к аминогликозидам (гентамицину и тобрамицину) выявлено 6 штаммов (50%), устойчивых к антибиотикам данной группы и 1 штамм с промежуточной устойчивостью к тобрамицину. 75% штаммов КОС были одновременно устойчивы к эритромицину и клиндамицину. Практически все они были чувствительны к ципрофлоксацину, тетрациклину и рифампицину. Устойчивостью к этим препаратам обладало 8,3–16,7% штаммов (рисунок 2).

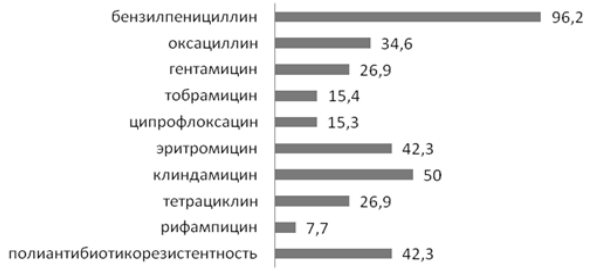



Рисунок 1 — Доля антибиотикорезистентных штаммов *S.aureus*

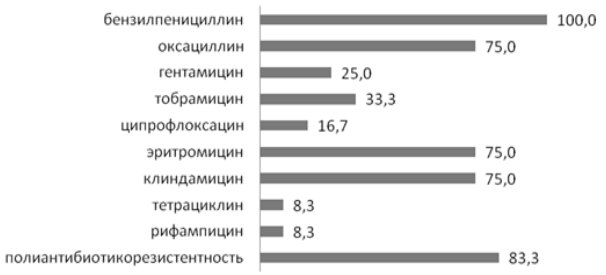



Рисунок 2 — Доля антибиотикорезистентных штаммов коагулазоотрицательных стафилококков, %

***3. Характеристика связи между антибиотико- и дезрезистентностью у клинических изолятов бактерий рода Staphylococcus.*** С целью изучения наличия или отсутствия причинно-следственных связей между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к дезинфектантам проведена сравнительная оценка штаммов по этим характеристикам: определена частота встречаемости штаммов с перекрестной резистентностью к антибиотикам и дезинфектантам и без таковой среди испытанных культур. Только у 3 исследованных штаммов стафилококков (7,9%) было установлено наличие перекрестной устойчивости к нескольким дезинфектантам и полиантибиотикорезистентность одновременно. Доля штаммов с перекрестной резистентностью среди штаммов с полиантибиотикорезистентностью составляла 14,2%, что недостоверно ниже доли этих штаммов среди изолятов с множественной устойчивостью к дезинфектантам (25,0%). Отсутствие взаимосвязи между множественной устойчивостью к дезсредствам и полиантибиотикорезистентностью подтверждается также отсутствием статистически достоверной корреляции ($p>0,05$). Однако при анализе показателей чувствительности стафилококков в отношении отдельных антибиотиков и дезинфектантов были выявлены ассоциации по этим признакам (таблица 3).

Так, среди всех стафилококков, чувствительных к дезинфектанту на основе ЧАС и антибиотикам оксациллину, эритромицину и клиндамицину, выявлена прямая статистически значимая корреляционная связь средней силы ($r=+0,42$ (для оксациллина), $r=+0,58$ (для эритромицина) и $r=+0,64$ (для клиндамицина), $p<0,05$).

На рисунке 3 представлены возможные общие мишени действия некоторых веществ с антимикробной активностью. Как видно из представленной схемы, точками приложения как антибиотиков, так и дезинфицирующих средств могут быть одни и те же структуры и физиологические процессы в микробной клетке.

На рисунке 3 представлены возможные общие мишени действия некоторых веществ с антимикробной активностью. Как видно из представленной схемы, точками приложения как антибиотиков, так и дезинфицирующих средств могут быть одни и те же структуры и физиологические процессы в микробной клетке.

Известно, что эритромицин и клиндамицин, несмотря на принадлежность к разным классам антибактериальных препаратов, имеют сходный механизм действия. Они оказывают бактериостатический эффект, связываясь с 50s субъединицей рибосом и блокируя, тем самым, синтез протеинов возбудителей. Кроме того, резистентность к эритромицину часто ассоциируется с таковой к клиндамицину (фенотип резистентности MLSb). Механизм действия оксациллина заключается в блокировании синтеза клеточной стенки бактерий за счет нарушения поздних этапов синтеза пептидогликана (препятствует образованию пептидных связей за счет ингибирования транспептидазы), вызывает лизис делящихся бактериальных клеток [7].

Таблица 3 — Сводная таблица частоты (%) устойчивых (R), умеренно устойчивых (I) и чувствительных (S) к антибиотикам стафилококков и устойчивых (res) и чувствительных (sens) к дезинфектантам штаммов стафилококков и корреляции (r) между чувствительностью – устойчивостью к антибиотикам и дезинфектантам

| ДЕЗИНФЕКТАНТЫ | | | АНТИБИОТИКИ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | β-лактамы | | | | Аминогликозиды | | | | | | Фторхинолоны | | | Макролиды | | Линкозамиды | | Тетрациклины | | Анзамицины | | |
| | | | PEN* | | OXA | | GEN | | | TOB | | | CIP | | | ERY | | CLI | | TET | | RAM | | |
| | | | R | S | R | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | S | R | S | R | S | R | S | |
| | | % | 97,4 | 2,6 | 47,4 | 52,6 | 18,4 | 7,9 | 73,7 | 15,8 | 5,3 | 78,9 | 13,2 | 2,6 | 84,2 | 55,3 | 44,7 | 57,9 | 42,1 | 21,1 | 78,9 | 7,9 | 92,1 | % |
| № 1 | *res* | 5,9 | 0,56 | | -0,28 | | -0,16 | | | -0,14 | | | -0,12 | | | -0,13 | | -0,15 | | 0,09 | | -0,09 | | коэффициент корреляции (r) |
| | *sens* | 94,1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| № 2 | *res* | 3,92 | -0,03 | | -0,16 | | -0,09 | | | -0,08 | | | -0,07 | | | -0,18 | | -0,19 | | -0,08 | | -0,05 | | |
| | *sens* | 60,8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| № 3 | *res* | 45,1 | 0,16 | | 0,42 (!) | | 0,21 | | | -0,00 | | | 0,06 | | | 0,58 (!) | | 0,64(!) | | -0,13 | | -0,29 | | |
| | *sens* | 54,9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| № 4 | *res* | 27,5 | -0,10 | | -0,14 | | -0,07 | | | 0,01 | | | -0,00 | | | -0,36 (!) | | -0,28 | | 0,24 | | 0,24 | | |
| | *sens* | 72,5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| № 5 | *res* | 3,9 | -0,04 | | 0,25 | | 0,25 | | | 0,32 | | | 0,43 (!) | | | 0,21 | | 0,20 | | 0,46 (!) | | 0,81 (!) | | |
| | ***sens*** | 96,1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Примечание. *PEN=penicillin; OXA=oxacillin; GEN=gentamicin; CIP=ciprofloxacin,TOB=tobramycin, ERY=erythromycin, CLI=clindamycin; TET=tetracycline, RAM=rifampicin.

(!) отмеченные корреляции значимы на уровне p<0,05.

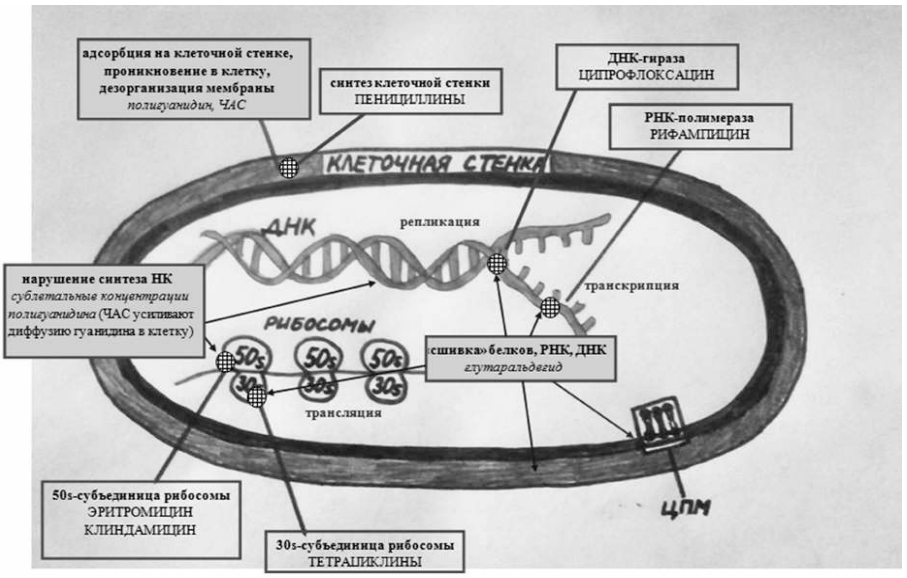



Рисунок 3 — Механизмы действия некоторых антибиотиков и дезинфектантов. Заштрихованным кругом обозначены возможные общие мишени действия антибиотиков и дезсредств, которые характеризовались корреляционной зависимостью между показателями

Действие катионных дезинфектантов (ЧАС и ПГМГ) обусловлено взаимодействием молекул активно действующего вещества (АДВ) с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, за которым следует ее дезорганизация и последующий лизис бактериальной клетки. Наличие в композиционных дезинфектантах ЧАС усиливает способность гуанидина связываться с поверхностью клетки и увеличивает диффузию ПГМГ через клеточную стенку, чем достигается доставка молекулы дезинфектанта к цитоплазматической мембране, биоцид связывается с белковыми и фосфолипидными молекулами мембраны, вызывает её дестабилизацию, нарушение барьерных и транспортных функций и деструкцию [14]. Субоптимальные концентрации катионных поверхностно активных веществ

(ЧАС и ПГМГ) вызывают менее глубокие изменения в структуре макромолекул цитоплазматической мембраны. Основной мишенью действия сублетальных концентраций ПГМГ по-видимому являются нуклеиновые кислоты микроорганизма. Исследователи Allen et al. показали в экспериментах in vitro способность молекул ПГМГ связываться с ДНК и тРНК с осаждением ассоциированого комплекса нуклеиновой кислоты и соли гуанидина. Предполагается, что при воздействии низких концентраций ПГМГ, ущерб, причиненный ДНК незначителен и возможна репарация генома [15], при этом, вероятно, возможна перестройка генетической и метаболической программ, реорганизации поверхностных структур бактериальной клетки с целью обеспечения выживания в неблагоприятных условиях [10].

При сравнении изолятов стафилококков, чувствительных к дезинфектанту на основе глутаральдегида и к ципрофлоксацину, тетрациклину и рифампицину также выявлена статистически значимая ($p<0,05$) корреляционная связь ($r=+0,43$, $r=+0,46$ и $+0,81$ соответственно). Альдегиды являются веществами с выраженными антимикробными свойствами, включающими активность в отношении всех видов микроорганизмов за счет алкилирования карбоксильных, гидроксильных, сульфгидрильных и аминных групп микроорганизмов, за счет чего происходит изменение РНК, ДНК и подавление синтеза белков (происходит «сшивка» макромолекул в клеточной стенке и везде в клетке) [14].

Рифампицин нарушает синтез РНК в бактериальной клетке, ингибируя ДНК-зависимую РНК-полимеразу. Тетрациклин связывается с 30S субъединицей рибосомы, что ингибирует связывание с ней тРНК, подавление белкового синтеза. Хинолоны оказывают бактерицидный эффект, ингибируя два жизненно важных фермента микробной клетки — ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, нарушают синтез ДНК [7].

При сравнении устойчивости стафилококков к дезинфектанту из группы полигуанидинов (№ 4) и эритромицину выявлена обратная статистически значимая связь средней силы ($r= -0,36$, $p<0,05$). Среди устойчивых к этому дезинфектанту штаммов большинство (72,7%) было чувствительно к эритромицину, и наоборот, более половины (66,7%) чувствительных к №4 стафилококков обладали устойчивостью к эритромицину.

Статистически значимая связь между устойчивостью стафилококков к остальным антибиотикам и дезинфицирующим препаратам не выявлена.

Выводы:

1. Среди клинических изолятов стафилококков отмечалось наличие устойчивости к дезинфектантам разных химических групп и полиантибиотикорезистентности.

2. *Staphylococcus aureus* обладали наибольшей устойчивостью к дезинфицирующему средству из группы четвертичных аммониевых соединений (45,1±5,9%, $p<0,05$). Среди коагулазоотрицательных стафилококков отсутствовали изоляты, резистентные к хлорсодержащему и пропанолсодержащему дезинфектантам, а также к дезинфектанту на основе глутарового альдегида.

3. Культуры стафилококков с повышенным уровнем резистентности составили 23,5±4,55% от общего числа исследованных штаммов. Из полидезрезистентных штаммов 66,7% были выделены с объектов внешней среды стационаров. 100% штаммов с повышенной резистентностью были одновременно устойчивы к дезинфектантам на основе гуанидина и комбинации гуанидина и ЧАС.

4. Выявлена гетерогенность популяций стафилококков по признакам устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам. Доля полиантибиотикорезистентных штаммов превышала долю штаммов с множественной устойчивостью к дезинфектантам (55,3±6,6% и 23,5±4,6% соответственно, $p< 0,05$)

5. При анализе результатов устойчивости к оксациллину, эритромицину и клиндамицину среди всех стафилококков, резистентных к дезинфектанту на основе ЧАС, выявлена прямая статистически значимая корреляционная связь средней силы ($r=+0,42$ (для оксациллина), $r=+0,58$ (для эритромицина) и $r=+0,64$ (для клиндамицина), $p<0,05$). При сравнении изолятов стафилококков, устойчивых к дезинфектанту на основе альдегида и к ципрофлоксацину, тетрациклину и рифампицину также выявлена статистически значимая ($p<0,05$) корреляционная связь ($r=+0,43$, $r=+0,46$ и $+0,81$ соответственно). При сравнении устойчивости стафилококков к дезинфицирующему средству с активно действующим веществом полигексаметиленгуанидином и эритромицину выявлена обратная статистически значимая связь средней силы ($r= -0,36$, $p<0,05$).

**Литература**

1. Европейский стратегический план действий по проблеме устойчивости к антибиотикам / ВОЗ, Европейский региональный комитет. 61-я сес , Баку, Азербайджан, 12–15 сент. 2011 г. // Документация ВОЗ (Резолюция EUR/RC61/R6) [электронный ресурс]. —Режим доступа http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0015/150612/RC61_Res_r06.pdf. — Дата доступа 10.09.2013.
2. Алексеева, И.Г. Сравнительная характеристика полиантибиотикорезистентности и устойчивости к дезинфектантам возбудителей внутрибольничных инфекций / И.Г. Алексеева, А.С. Благонравова, О.В.Ковалишена // Ремедиум Приволжье. — 2010. — № 1.
3. Проблема внутрибольничных инфекций в Республике Беларусь: основные направления, перспективы борьбы и профилактики / Е.И. Гудкова [и др.] // Белорус. мед. журн. — 2005. — № 2. — С. 4–7.
4. Микробиологический мониторинг госпитальных эковаров условно-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций / Е.И. Гудкова [и др.] // Мед. новости. — 2003. — № 3. — С. 11–15.
5. Титов, Л.П. Контроль за внутрибольничными инфекциями, их этиологической структурой и резистентностью к антибиотикам / Л.П. Титов, Т.С. Ермакова, В.А. Горбунов // Здравоохранение. — 2009. — № 10. — С. 63– 66.
6. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 / A.I. Hidron [et al.] // Infect. Control Hospit. Epidemiol. —2008. — Vol. 29, № 11. — P. 996–1011.
7. Антибактериальная терапия: практ. рук. / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М.: Фармединфо, 2000. — 190 с.
8. Титов, Л.П. Антибиотикорезистентность бактерий: потребление антимикробных препаратов, ассоциация с резистентностью и вирулентностью / Л.П. Титов // Профилактика и лечение госпитальных инфекций. Резистентность микроорганизмов к химиопрепаратам: материалы респ. науч.-практ. конф. — Минск, 2006. — С. 7–17.
9. Russell, A.D. Biocides and pharmacologically active drugs as residues and in the environment: is there a correlation with antibiotic resistance? / A.D. Russell // Am. J. Infect. Control. — 2002. — Vol. 30, № 8. — P. 495–498.
10. Gomez, E. Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of E. coli and *Ps. aeruginosa* / E. Gomez, J.L. Harwood // J. Antimicrob. Chemother. — 2005. — Vol. 55. —P. 879–882.
11. Mc Cay, P.H. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of Pseudomonas aeruginosa grown in continuous culture / P.H. Mc Cay. A.A. Ocampo-Sosa, G.T.A. Fleming // Microbiol. — 2010. — Vol. 156. — P. 30–38.
12. Определитель бактерий Берджи: в 2-х тт. / Под ред. Дж. Хоулта [и др.]. — М.: Мир, 1997. — Т. 1. — 430 с.; Т. 2. — 800 с.
13. Методы проверки и оценки антимикробной активности дезинфицирующих и антисептических средств: инструкция по применению МЗ РБ / В.П. Филонов [и др.]. — Минск, 2003. — 41 с.
14. McDonnell, G. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance / G. McDonnell, A.D. Russel // Clin. Microbiol. Rev. — 1999. — № 12. — P. 147–149.
15. Allen, M.J. The response of Escherichia coli to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide / M.J. Allen, A.P. Morby, G.F. White // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2004. —Vol. 318, № 2. — P. 397–404.

## COMPARATIVE CHARACTERISTIC AND ASSOCIATION BETWEEN SENSITIVITY AND RESISTANCE OF CLINICAL ISOLATES OF *STAPHILOCOCCI* TO ANTIBIOTICS AND DISINFECTANTS

**Gavrilova I.A.[1], Titov L.P.[2]**

*[1]Belarusian State Medical University;*

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

Because biocides, unlike antibiotics, act concurrently on multiple sites within the bacterial cell, resistance is often mediated by non-specific means. However, there are reports of the development of resistance to antibiotics in bacterial cultures grown in the presence of sublethal concentrations of biocides. In this study a link between biocide resistance and antibiotic resistance of Staphylococcus was demonstrated

**Keywords:** monitoring of antibiotic resistance, resistance to disinfectants, staphylococci.

Поступила 04.09.2013

# ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

**Газиумарова Л.Д.[1], Титов Л.П.[1], Бакаева Т.Н.[1], Левшина Н.Н.[2], Рогачева Т.А.[3], Белановская Л.И.[3], Филипенок С.С.[4], Федорович Е.В.[4]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии;*

*[3]Городская клиническая инфекционная больница;*

*[4]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В настоящем исследовании были рассмотрены вопросы испытания новых питательных сред для диагностики листериозов, а также идентификации и чувствительности к антибиотикам выделенных штаммов.

Сравнительный анализ результатов этих испытаний показал подтверждение идентификации выделенных культур до 96%.

**Ключевые слова:** *Listeria*, питательные среды, выделение, идентификация.

**Введение.** В конце прошлого — начале текущего века описаны крупные вспышки листериоза у людей в странах Западной Европы и Северной Америки (США) [1, 2]. Внезапность, с которой *Listeria monocytogenes* возникла как этиологический агент пищевого заболевания, не имеет аналогов [3]. Значительный рост числа эпидемиологических вспышек и спорадических случаев заболеваний листериозом стал серьезным толчком к разработке новых эффективных методов диагностики этой инфекции. Важнейшим элементом современных схем выделения листерий стало использование сухих селективных питательных сред [4, 5, 6]. Их применение значительно повысило эффективность выделения листерий из клинического материала и продуктов питания по сравнению с ранее применявшимися средами (кровяной агар, мясо-пептонный агар или агар Хоттингера с теллуритом калия и полимиксином). Причем, схемы выделения листерий отличаются друг от друга в зависимости от исследуемого клинического материала и предусматривают использование различных по составу питательных сред. Процедура выделения культур из нестерильных биологических жидкостей как и из пищевых продуктов включает либо непосредственный высев на селективный агар, либо его обогащение в накопительном бульоне с последующим высевом на селективный агар [7]. Широкий полиморфизм листериозного микроба, непостоянство биохимических и биологических признаков, диктуют необходимость разработки новых средств и подходов к их идентификации.

Нами (2011–2012 г) были разработаны сухие питательные среды для накопления и выделения листерий из различных клинических источников, пищевых продуктов и объектов внешней среды [8, 9].

**Цель** настоящего исследования: верифицировать культуры рода листерия, выделенные из различных клинических источников, пищевых продуктов, изучить их биологические свойства и антибиотикочувствительность.

**Материалы и методы.** В общей сложности изучено и идентифицировано 25 штаммов культур рода листерия:. *Listeria monocytogenes* — 11 штаммов, *Listeria ivanovii* — 2 штамма, *Listeria innocul* — 6 штаммов, *Listeria grayi* — 1 штамм, *Listeria seeligery* — 2 штамма, *Listeria welschimeri* — 3 штамма. Ростовые свойства культур изучались на разработанных нами средах, сконструированных на основе гидролизата мяса ферментативного, а также морфологические и тинкториальные с использованием метода окраски по Грамму. Идентификацию выделенных штаммов проводили на наборе API-Listeria (Биомерье, Франция) и в параллельных опытах на бактериологическом анализаторе Vitek Biomeriux, France.

Интерпретацию результатов биохимического тестирования осуществляли по Инструкции прилагаемой к набору API-Listeria. Из всей коллекции культур, которыми располагает лаборатория определяли чувствительность к антибиотикам у 8 наиболее значимых по клиническим данным штаммов. Антибиотикочувствительность определяли на бактериологическом анализаторе Vitek к 9 антибиотикам: ампициллину, гентамицину,пенициллину, эритромицину, клиндамицину, хлорамфениколу, офлоксацину, линкомицину, линезолиду. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью программы STATISTIKA 7,0.

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что листерии обладают высокой метаболической активностью и хорошо растут на средах с повышенным содержанием аминного азота до 100–110 мг%. В соответствии с вышеприведенными критериями разработанные нами препараты содержали от 2,7 до 3,5% аминного азота, отличались хорошими вегетериующими свойствами, обеспечивали рост выделяемых культур при посеве минимальных посевных доз (0,1 мл из $10^{-7}$ и $10^{-6}$ разведения соответственно для среды накопления и выделения листерий).

Кроме того, нужно отметить и тот факт, что разработанные среды по компонентному составу содержат меньшее количество ингредиентов по сравнению с известными, а простота в приготовлении и возможность выпуска в виде коммерческого препарата показывают перспективность их использования для диагностики листериозной инфекции.

Наборы сред вместе с технической документацией прошли сантитарно-гигиеническую экспертизу в РЦГЭиОЗ и вместе с утвержденными эпидпрограммами проходят испытания на базах, рекомендованных Центром экспертиз.

**1. Верификация штаммов рода *Listeria.*** Как уже отмечалось выше, одним из основных этапов лабораторной диагностики листерий является идентификации культур по биохимическим тестам. Особое значение имеют тесты, позволяющие идентификацию *Listeria monocytogenes* совместить с дифференциацией от других патогенных для человека листерий. Выделенную культуру изучали микроскопически с использованием метода окраски по Грамму. Поскольку образцы, как правило, содержат несколько типов *Listeria*, предварительно делали пересев на кровяной агар одной из изолированных колоний с параллельным высевом культур *Rhodococcus equa* и *Staphylococcus aureus* (Camp-тест). Отмечали форму и размеры зон гемолиза около родококка. Идентификацию культур, выделенных непосредственно из нативного материала производили со скошенного питательного агара. Для ускоренной идентификации листерий использовали системы API-Listeria (Биомерье, Франция) по прилагаемой к ней Инструкции [10], а также бактериологический анализатор Vitek Biomeriux, France. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты биохимического тестирования листерий

| № п/п | Исследуемый материал | Кол-во проб | Идентификация культур | |
|---|---|---|---|---|
| | | | (Api Listeria) | Vitek 2 |
| 1 | Отделяемое глаз | 2 | L.monocytogenes | подтверждено |
| 2 | Отделяемое зева | 2 | L.monocytogenes | подтверждено |
| 3 | Плацента | 1 | L.monocytogenes | не подтверждено |
| 4 | Пуповина | 1 | L.monocytogenes | подтверждено |
| 5 | Околоплодные воды | 1 | L.monocytogenes | подтверждено |
| 6 | Кровь | 1 | L.monocytogenes | подтверждено |
| 7 | Ликвор | 1 | L.monocytogenes | подтверждено |
| 8 | Шпик свиной | 2 | L.monocytogenes | подтверждено |
| 9 | Фарш домашний | 1 | L. innocua | подтверждено |
| 10 | Мясо говядины | 1 | L. innocua | подтверждено |
| 11 | Сердце говяжье | 1 | L. welshimeri | подтверждено |
| 12 | Язык говяжий | 1 | L. welshimeri | подтверждено |
| 13 | Почки говяжьи | 1 | L. welshimeri | подтверждено |
| 14 | Сыр «Российский особый | 1 | L. ivanovii | подтверждено |
| 15 | Сыр сливочный | 1 | L. seeligeri | подтверждено |
| 16 | Сыр «Воскресенский» | 1 | L. ivanovii | подтверждено |
| 17 | Молоко сухое обезжиренное | 1 | L. seeligeri | подтверждено |
| 18 | Мясо птицы (окорочок) | 1 | L. innocua | подтверждено |
| 19 | Печень и сердце куриное | 1 | L. innocua | подтверждено |
| 20 | Шеи кур | 1 | L. grayi | подтверждено |
| 21 | Капуста брокколи | 1 | L. innocua | подтверждено |

Сравнительный анализ этих испытаний показал совпадение в диагностике выделенных культур до 96%. Несовпадение данных одного анализа (№ 3) на принадлежность культуры к *L.monocytogenes* было дополнительно проверено с помощью ПЦР-анализа, показавшего отрицательный результат, что указывает на широкий полиморфизм листериозного микроба.

**2. Определение чувствительности к антибиотикам *Listeria monocytogenes*ю** Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам имеет важное значение для рациональной химиотерапии, для оценки новых препаратов, эпидемиологических исследований и особенно в отношении малоизученных инфекций.

В этой связи нами исследована чувствительность к антибиотикам 8 наиболее значимых по клиническим данным штаммов. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Чувствительность культур рода *Listeria* к антибиотикам

| Антибиотики | Источники выделения | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | клинический материал | | | | | | пищевые продукты | |
| | зев | глаза | плацента | зев | пуповина | кровь | шпик | шпик |
| Ампициллин | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Гентамицин | - | - | - | - | - | S | S | S |
| Пенициллин | - | - | - | - | - | S | R | S |
| Эритромицин | S | S | S | S | S | S | R | R |
| Клиндамицин | - | - | - | - | - | R | R | R |
| Хлорамфеникол | - | - | - | - | - | S | S | S |
| Офлоксацин | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Линкомицин | I | I | I | I | I | R | R | I |
| Линезолид | S | S | S | S | S | S | S | S |

Примечания.
1. I — умеренно чувствительный.
2. R — резистентный.
3. S — чувствительный.

Как показано в таблице 2 оценка антибиотикограмм изученных штаммов выявила в 100% случаев чувствительность их к офлоксацину, ампициллину, линезолиду. Остальные штаммы проявили некоторую вариабильность в отношении в чувствительности к выбранным антибиотикам.

Из 8 изолятов 2 были устойчивы к эритромицину, 5 обладали умеренной резистентностью к линкомицину или были устойчивы к нему. Выделенные штаммы законсервированы при температуре -25°С в лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии, а также переданы в коллекцию и криобанк центра.

**Выводы.** 1. Разработаны и внедряются в практику сухие питательные среды для накопления и выделения листерий из различных клинических источников, пищевых продуктов и объектов внешней среды. Использование новых препаратов в системе здравоохранения повысит результативность микробиологических и санитарно-бактериологических исследований на наличие листериозной инфекции.

2. Проведена идентификация выделенных штаммов культур листерий по упрощенной схеме и с использованием ускоренного определения их видового состава на основе ферментативных систем. Совпадение результатов тестирования до 96% указывает на высокую диагностическую эффективность обоих вариантов для дифференциации патогенных и непатогенных видов листерий.

3. Определена чувствительность к антибиотикам наиболее значимых по клиническим данным штаммов. Подобраны наиболее эффективные в отношении листерий антибиотики, что позволяет сформулировать схему подбора рациональной химиотерапии для больных и бактерионосителей.

**Литература**

1. Donnelly, C.N. L.monocytogenes / C.N. Donnelly // In; Foodborne Disease Handbook / Ed. Y.H. Hui, SH.D. Pierson, J.R. Gorham. — Missouri, 2001. — P. 213–245.

2. Heat resistance of Listeria monocytogenes // M.E. Doyle [et al.] // J. Food Project. — 2001. — Vol. 64. — P. 110–429.

3. Джей, Д.М. Современная пищевая микробиология / Д.М. Джей, М.Дж. Лесснер, Д.А.Гольден. — Москва: Бином, лаборатория знаний, 2012. — 692 с.
4. Biosciences Catalogue. Microbiology, Animal Cell Culture, Plant & Jnsect Tissue Culture, Molecular Biology Products Himedia Laboratories, 2008–2009.
5. Комментированный каталог «Готовые питательные среды» / Науч.-исслед. центр фармакотерапии (НИИЦФ). — СПб.г, 2005. — С. 14–15.
6. Алиева, Е.В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммунодиагностических препаратов для выявления возбудителей листериоза и кампилобактериоза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2008.
7. Тартаковский, И.С. Листериоз: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева. — М., 2002. — 200 с.
8. Разработка сухого питательного бульона для выделения листерий / Л.Д. Газиумарова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2011. — Вып. 4. — С. 250–254.
9. Разработка сухой селективной среды для выделения листерий / Л.Д. Газиумарова [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 10. — С. 17–21.
10. Микротест система для биохимической идентификации листерий (Api-Listeria). Инструкция по применению, 2011/1.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FOODBORNE AND CLINICAL SPECIMEN *LISTERIA SPP.*

**Gaziumarova L.D.[1], Titov L.P.[1], Bokajeva T.N.[1], Levhina N.N.[2], Rogacheva T.A.[3], Belanovskaja A.I.[3], Filipenok S.S.[4], Fedorovich E.V.[4]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Minsk Municipal Center Hygiene and Epidemiology;*

*[3]Municipal Clinical Hospital of Infectious Diseases;*

*[4]State Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus*

Listeriosis is a bacterial infection most commonly caused by *Listeria monocytogenes*.

The aim of the study is develop and test the new culture media for the diagnosis of listeriosis, as well as the identification and antibiotic susceptibility testing of the isolated strains using 2 methods: the system API-Listeria and bacteriological analyzer Vitek (Biomerieux, France). Comparative analysis of the results of these tests showed the results match in isolates identification up to 96%.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, nutrient media, isolation, identification.

Поступила 02.09.2013

## ЭЛАСТАЗНАЯ И БАПНА-АМИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

**Гончарова А.И., Окулич В.К., Савкина М.А.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** В данной работе был апробирован метод определения эластазной активности ротовой жидкости у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области. Средний уровень эластазной активности ротовой жидкости у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области оказался достоверно выше, чем у доноров — 0,039 Еоп. (медиана — 0,024), p =0,039. Также была проведена оценка БАПНА-амидазной активности у доноров и у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области (при сравнении средних уровней показателей достоверно подтвержденных отличий обнаружено не было).

**Ключевые слова:** гнойно-воспалительные заболевания, эластазная активность, БАПНА-амидазная активность.

**Введение.** Гнойно-воспалительные заболевания составляют основную группу наиболее часто встречающихся заболеваний челюстно-лицевой области. Пациенты с гнойно-воспалительными

процессами составляют 10–20% хирургических больных, обращающихся в стоматологические поликлиники, и около 50% пациентов в челюстно лицевых стационарах [1, 2].

Отличительной особенностью воспалительных заболеваний в челюстно-лицевой области является то, что все они являются инфекционными, т. е. в их возникновении, развитии и течении большая роль принадлежит микробной флоре. Характерной чертой современных гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области является их полиэтиологичность. Видовой состав микроорганизмов из очагов воспаления при одонтогенном, травматическом остеомиелите, аденофлегмонах разнообразен, представлен представителями биоценоза полости рта и может изменяться под влиянием целого ряда внешних и внутренних факторов [3].

Многие вопросы этиологии и патогенеза, профилактики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области до настоящего времени остаются недостаточно решенными, что объясняет постоянный интерес и внимание к ним исследователей.

В настоящее время отмечается повышенный интерес к разработке неинвазивных методов диагностики, что определяется стремлением получить диагностическую информацию о важнейших биохимических показателях, по возможности не нарушая естественные барьеры. При технической простоте и доступности получения слюны она является ценным материалом для получения сведений о реакциях организма больного.

Исследование слюны является одним из распространённых неинвазивных методов оценки общего состояния организма, а также органов полости рта. Особое место среди биохимических показателей слюны занимает определение протеолитической активности [4].

**Цель:** апробировать метод определения эластазной активности ротовой жидкости у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области и провести оценку БАПНА-амидазной активности у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области.

Материалы и методы исследования. Обследовано 17 пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области, находившихся на лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница» и 30 доноров. Забор ротовой жидкости осуществляли натощак в стерильные пробирки, у пациентов в день госпитализации до проведения оперативного вмешательства. По нозологии пациенты были распределены следующим образом: одонтогенный абсцесс имел место у 4 пациентов, одонтогенная флегмона — у 6, острый гнойный одонтогенный периостит – у 4, острый сиалоаденит – у 2, посттравматический остеомиелит — у 1 пациента. Среди пациентов было 6 женщин и 11 мужчин. Оценка эластазной активности ротовой жидкости была проведена у 17 пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области и у 30 доноров. БАПНА-амидазная активность ферментов слюны была оценена у 10 пациентов и у 22 доноров.

Нами была апробирована методика определения эластазной активности слюны. Была модифицирована методика определения активности эластазы в биологических жидкостях [5]. Сущность модификации заключалась в том, что вместо дорогостоящих фильтров, предназначенных для извлечения из раствора остатков эластин-Конго красного, было применено осаждение субстрата путём центрифугирования [6].

Для определения эластазной активности пробы, содержащие ротовую жидкость, перед использованием осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10 тыс. об/мин; центрифуга MICRO 120). Для постановки метода использовали эластин-Конго красный (диаметр частиц 37–75 мк, производство Sigma) в концентрации 0,8 мг на 1 мл буфера как субстрат для фермента, ротовой жидкости и буферного раствора (0,2М солянокислый трис-буфер) с pH 7,4, так как у нейтрофильной эластазы оптимум pH 7,4. Эластаза расщепляла эластин, и конго-красный переходил в раствор, изменяя его цвет с бесцветного на красный с максимальным спектром поглощения 495 нм.

Для удобства постановки вместо пробирок использовались эппендорфы. В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 400 мкл раствора эластин-Конго красного на трис-HCl буфере pH 7,4 и 100 мкл ротовой жидкости. Контролем служили пробы, содержащие буферный раствор с соответствующим pH в количестве 400 мкл и 100 мкл ротовой жидкости, чтобы исключить влияние оптической плотности ротовой жидкости на результаты определения активности фермента. Далее проводили инкубацию проб в термостате при t=37°C в течение 24 ч. Затем пробы извлекали из тер-

мостата и центрифугировали в течение 10 мин (10 тыс об/мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося эластина-Конго красного в виде не разрушенных частиц. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96 луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 495 нм определяли оптическую плотность в лунках. Результат выражался в оптических единицах (Еоп.) рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для определения БАПНА-амидазной активности слюны у доноров в качестве субстрата протеолиза использовали бензоиларгинин-р-нитроанилид. Выбор субстрата обусловлен тем, что распад БАПНА происходит только в результате расщепления амидной (аналога пептидной) связи по аминокислотам Arg-Lis. В лунки плоскодонного стерильного планшета для ИФА вносилось 0,2 мл раствора БАПНА (24 мг БАПНА растворяется в 0,9 мл диметилсульфоксида и доводится до 30 мл 0,05М трис-NaOH буфером-pH 7,4) и 40 мкл ротовой жидкости. Учет результатов реакции осуществлялся после 20-часовой инкубации при температуре 37,6°С на анализаторе иммуноферментном фотоэлектрическом при длине волны 410 нм. Для пересчета полученного результата в пикокаталы нами была использована формула:

$$Y = 0{,}028+11\times Еоп.,$$

где Y — искомый результат;

Еоп — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере, используя пакеты прикладных программ Microsoft Excel 2007, STATISTIKA 6.0.

**Результаты и их обсуждения.** При оценке эластазной активности ротовой жидкости здоровых лиц установлено, что её средний уровень составил 0,022 Еоп. (медиана — 0,016). Средний уровень эластазной активности ротовой жидкости у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области оказался достоверно выше, чем у доноров – 0,039 Еоп. (медиана — 0,024), р =0,039. Расчет производили, используя методы непараметрической статистики, в частности критерий Манна–Уитни, так как закон распределения отличается от нормального. При сравнении средних уровней БАПНА-амидазной активности слюны у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области и у доноров достоверно подтвержденных отличий обнаружено не было (доноры — 3,07 Пкат, медиана — 2,48; пациенты — 3,93 Пкат, медиана — 2,24; р>0,05).

**Выводы:**

1. Аробирован метод определения эластазной активности в слюне.
2. Установлен достоверно более высокий уровень активности эластазы в слюне у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области.
3. Достоверно подтвержденных отличий средних уровней БАПНА-амидазной активности слюны у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области от доноров выявлено не было.

**Литература**

1. Агапов, В.С. Инфекционные воспалительные заболевания челюстно-лицевой области / В.С. Агапов, С.Д. Артюнов, В.В. Шулаков. — М.: МИА, 2004.
2. Шаргородский, А.Г. Воспалительные заболевания тканей челюстно-лицевой области и шеи / А.Г. Шаргородский. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2001.
3. Супиев, Т.К. Гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области / Т.К. Супиев. — М.: МЕДпресс, 2001. — 160 с.
4. Слюнные железы (биохимия, физиология, клинические аспекты) / Л.М. Тарасенко [и др.]. — Томск: Изд-во НТЛ, 2002. — 124 с.
5. Ohman, D.E. Isolation and characterization of a Pseudomonas aeruginosa PAO mutant that produces altered elastase / D.E. Ohman, S.J. Cryz, B.H. Iglewski // J. Bacteriol. — 1980. — Vol. 142. — P. 836–842.
6. Определение активности эластазы в биологических жидкостях / В.К. Окулич [и др.] // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. — 2012. — № 67. — С. 100–101.

## ELASTASE AND BAPNA-AMIDASE ACTIVITY THE ORAL FLUID IN PATIENTS WITH PYOINFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION

**Goncharova A.I., Okulich V.K., Savkina M.A.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

In this work was validated method for determining the elastase activity of the oral fluid of patients with pyoinflammatory diseases of the maxillofacial region. The average level of elastase activity of the oral fluid of patients with pyoinflammatory diseases of the maxillofacial region was significantly higher than that of the donor 0.039 Еоп. (median — 0.024), p=0.039. Also assessed BAPNA-amidase activity in donors and patients with pyoinflammatory diseases of the maxillofacial region (comparing average levels of performance reliably attested differences have been found).

**Keywords:** pyoinflammatory diseases, elastase activity, BAPNA-amidase activity.

Поступила 02.09.2013

## ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

**Горбунов В.А., Ермакова Т.С., Титов Л.П., Винничек Л.А., Дашукевич Л.И.**

*РПНЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям в амбулаторной урологической практике. Ведущими возбудителями ИМП являются грамотрицательные аэробные микроорганизмы, первое место среди которых занимает кишечная палочка. Грамотрицательные бактерии (клебсиелла, протей) и грамположительные кокки (стафилококки и энтерококки) также играют важную роль в развитии этих инфекций. В статье представлен подробный анализ наиболее многочисленных групп антибактериальных препаратов и их микробиологической активности.

**Ключевые слова:** инфекции мочевыводящих путей, грамотрицательная микрофлора, грамположительная микрофлора, антимикробные препараты, антибиотикорезистентность.

**Введение.** Инфекции мочевыводящих путей относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям в амбулаторной урологической практике, которые требуют значительных финансовых затрат на лечение. Заболеваемость ИМП в России очень высока: ежегодно регистрируется от 26 до 36 млн случаев. В США на ИМП приходится более 7 млн обращений к врачу; прямые и непрямые затраты на ИМП превышают 1,6 млрд долларов в год [1, 2. 6]. Около 15% всех амбулаторно назначаемых в США антибиотиков, общей стоимостью более 1 млрд долларов в год, выписываются по поводу ИМП [6–9]. В развитых странах это самые частые инфекции у женщин репродуктивного возраста (20–40 лет) [1, 5]. В течение года у 25–35% пациенток отмечается хотя бы один эпизод ИМП [5]. У мужчин в возрасте 21–50 лет в Норвегии заболеваемость очень низкая, составляет 6–8 эпизодов в год на 10000 мужчин. Однако у возрастной категории 65–75 лет она существенно возрастает, приближаясь к такому же уровню, как и у женщин [8, 9].

Ключевым моментом в терапии инфекций мочевыводящих путей является применение антибактериальных препаратов. Ежегодно в США только на лечение неосложненных ИМП у молодых женщин затрачивается около 1 млрд долларов США, при этом прямые затраты на один эпизод ИМП составляют около 40–80 долларов [7]. Очевидно, что антибактериальная терапия ИМП является не только медицинской, но и важной экономической проблемой, обуславливающей значительные затраты при нерациональном ее проведении. Сложности при антибактериальной терапии связаны с повсеместным ростом резистентности возбудителей этих инфекций и частым выделением мультирезистентных штаммов с ассоциированной резистентностью ко многом классам антимикробных препаратов.

Наибольшая частота эмпирически назначаемых антибиотиков приходится на амбулаторную практику поликлинического звена учреждений здравоохранения, и в этой связи назначение препа-

ратов врачами без определения этиологической значимости микроорганизмов и чувствительности к антибиотикам в большинстве случаев бывают не только не рациональны, но и ничем необоснованны. Складывается ситуация, когда назначаемые годами и привычные препараты оказываются просто недейственны, что весьма серьезно отражается на эффективности лечебного процесса. Специалистам необходимы знания о преобладающих возбудителях, профиле их антибиотикорезистентности, который может иметь выраженные локальные особенности. Крайне важно обеспечить адекватное лечение ИМП, решить вопрос о необходимости назначения антибактериальной терапии, выбрать препараты, наиболее активные в отношении этиологических возбудителей. Это обуславливает целесообразность проведения локальных микробиологических исследований.

**Целью** настоящей работы явился анализ видового состава этиологически значимых бактериальных возбудителей внебольничной уропатогенной микрофлоры ИМП и изучение активности антибиотиков широко применяемых в эмпирической терапии в отношении этих микроорганизмов, выделенных от пациентов обратившихся, в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

**Материал и методы.** Исследования выполнены в лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии с января 2012 г. по август 2013 г. Бактериальные возбудители были выделены от 140 пациентов в возрасте 18–65 лет с симптомами ИМП, не находящихся на стационарном лечении. Всего выделено и идентифицировано 197 изолятов.

Материалом для исследования служили пробы мочи, отобранные в соответствии с инструкцией по применению «Микробиологические методы исследования биологического материала» [3].

Исследовали следующие группы бактерий: стрептококки, энтерококки, стафилококки, энтеробактерии. Не позднее 1–2 ч от момента забора засевали на чашки с 5% кровяным, желточно-солевым агаром, эндо-агаром, энтерококк-агаром, конго-рот агаром. Идентификацию выделенных аэробных и факультативно анаэробных культур бактерий проводили на основании морфологических, культуральных и биохимических свойств стандартными методами [3].

Верификацию видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и определение антибиотикочувствительности проводили на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact (Biomerieux).

Определение антибиотикочувствительности идентифицированных микроорганизмов проводили дискодиффузионным методом в соответствии с инструкцией по применению «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [3]. В качестве среды для определения антибиотикочувствительности использовали Мюллер–Хинтон агар. Контроль качества проводили с использованием соответствующих референтных штаммов: для представителей семейства *Enterobacteriaceae* — *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Escherichia coli* ATCC 35218, для стафилококков — *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. В работе использовались среды и реактивы российского производства, тест-системы для биохимической идентификации энтеробактерий производства ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ «Статистика 6.0».

**Результаты и их обсуждение.** Мочевыводящие пути представляют собой стерильное пространство с непроницаемой внутренней выстилкой. Самым частым механизмом развития инфекций является ретроградное восходящее проникновение возбудителей.

Посев клинического материала на дифференциально-диагностические среды с полуколичественной оценкой выделенной микрофлоры позволил выявить этиологически значимые титры инфекционного агента (103 кл/мл и выше), дает возможность в максимально короткие сроки изучить его антибиотикорезистентность и вирулентность, что помогает в выборе лекарственных препаратов для стартовой антибактериальной терапии.

По данным Европейской урологической ассоциации, ведущими возбудителями неосложненных ИМП являются энтеробактерии, среди которых первое место занимает Escherichia coli. Однако грамотрицательные бактерии (например, клебсиелла, протей) и грамположительные кокки (например, стафилококки и энтерококки) также играют важную роль в развитии этих инфекций [10].

Исследования представленные в данной статье проводились на 197 идентифицированных аэробных бактериях выделенных от 140 пациентов, из них в 60% случаев изоляты были выделены в виде монокультуры (84 от 140 образцов клинического материала), а в микробных ассоциациях — в 40% случаев (56 от 140 образцов клинического материала).

Данные, характеризующие спектр и удельный вес уропатогенов, выделенных у пациентов с неосложненными ИМП, представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Структура и удельный вес бактериальных возбудителей неосложненных ИМП

| Возбудитель | Количество штаммов | Удельный вес, % |
|---|---|---|
| Семейство *Enterobacteriaceae* | | |
| *Escherichia coli* | 136 | 69,1 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 10 | 5,0 |
| *Proteus mirabilis* | 4 | 2,0 |
| Семейство *Staphylococcaceae* | | |
| *Staphylococcus saprophyticus* | 21 | 10,7 |
| *Staphylococcus aureus* | 6 | 3,1 |
| *Staphylococcus haemolyticus* | 9 | 4,5 |
| Семейство *Enterococcaceae* | | |
| *Enterococcus faecalis* | 11 | 5,6 |
| ИТОГО | 197 | 100 |

Как видно из таблицы, преобладающими возбудителями ИМП в клиническом материале были грамотрицательные бактерии семейства Enterobacteriaceae (6,1%) и представители семейства *Staphylococcaceae* (18,3%), которые в сумме по удельному весу составляли 94,4% от общего числа идентифицированных штаммов.

Наиболее часто из клинического материала выделялись кишечные палочки (*Escherichia coli* составляли 69,1%), значительно реже ИМП вызывал представитель семейства стафилококков — *Staphylococcus saprophyticus* (10,7%), в сумме по удельному весу эти возбудители составляли 79,8% от общего числа идентифицированных штаммов, в 5,6% случаев возбудителем являлся E*nterococcus faecalis*. Остальные уропатогены, представленные в таблице 1, составили 14,6% от всех выделенных и идентифицированных изолятов.

Монокультура *Escherichia coli* была выделена у 60 пациентов, *Proteus mirabilis* — у 60 пациентов, а *Staphylococcus saprophyticus* — у 15, что составило 42,9 и 10,7% от общего числа исследованных образцов клинического материала соответственно. Среди микробных ассоциаций наиболее часто встречались *Escherichia coli — Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae — Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus — Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli — Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus — Klebsiella pneumoniae.*

Как свидетельствуют литературные данные, устойчивость к антимикробным препаратам этиологически значимых уропатогенов внебольничных ИМП из года в год возрастает [5].

Определяющим фактором возможности применения антибиотика при урогенитальных инфекциях является определение его активности против доминирующих возбудителей, поэтому представляло интерес выявить наиболее эффективные антимикробные препараты, которые применяются в практическом здравоохранении.

Основной возбудитель ИМП — *Escherichia coli*, проявляющий природную чувствительность к большинству антибиотиков. Однако в связи с необоснованным и нерациональным применением антибиотиков появились и распространяются резистентные штаммы, что приводит к ограничению выбора антимикробных лекарственных препаратов.

Результаты определения антибиотикочувствительности грамотрицательных штаммов микроорганизмов представлены в таблице 2.

В нашем исследовании (таблица 2) высокий уровень чувствительности внебольничных штаммов *E. coli* отмечен к фосфомицину, пиперациллин/тазобактаму, цефтриаксону, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, офлоксацину, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, левофлоксацину, гентамицину, амикацину, нитрофурантоину (100–84,6% ), более низкий уровень — к амоксициллин/клавуланату (72,1%), ко-тримоксазолу (77,9%). Чувствительность других энтеробактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) к антибиотикам была закономерно ниже, в отношении этих бактерий

наименьшее количество устойчивых штаммов наблюдалось к фосфомицину, цефотаксиму, ципрофлоксацину, моксифлоксацину(100–80,0% чувствительных штаммов), а также к амикацину (80,0% чувствительных штаммов *Klebsiella pneumoniae*).

Таблица 2 — Результаты определения антибиотикочувствительности грамотрицательных штаммов уропатогенов

| Антимикробные препараты | Количество чувствительных штаммов, % | | |
|---|---|---|---|
| | *E. coli*, n=136 | *K. pneumonia*, n=10 | *P. mirabilis*. n=4 |
| Фосфомицина трометамол | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Амоксициллин/ клавуланат | 72,1 | 60,0 | 50,0 |
| Пиперациллин/ тазобактам | 89,0 | 70,0 | 70,0 |
| Цефуроксим | 88,5 | 40,0 | 50,0 |
| Цефтриаксон | 89,0 | 60,0 | 70,0 |
| Цефтазидим | 91,9 | 70,0 | 75,0 |
| Цефотаксим | 92,0 | 75,0 | 75,0 |
| Цефепим | 95,6 | 80,0 | 100,0 |
| Офлоксацин | 84,6 | 70,0 | 50,0 |
| Ципрофлоксацин | 84,6 | 80,0 | 80,0 |
| Моксифлоксацин | 97,1 | 80,0 | 80,0 |
| Левофлоксацин | 92,6 | 70,0 | 75,0 |
| Гентамицин | 89,7 | 70,0 | 50,0 |
| Амикацин | 97,8 | 80,0 | 75,0 |
| Ко-тримоксазол | 77,9 | 40,0 | 25.00 |
| Нитрофурантоин | 89,0 | 40,0 | 0 |

Несмотря на тенденцию постоянного роста резистентности к антимикробным препаратам представителей семейства Enterobacteriaceae, все исследованные штаммы проявили высокую чувствительность к фосфомицина трометамолу.

Результаты определения антибиотикочувствительности грамположительных штаммов уропатогенов представлены в таблице 3.

Как следует из приведенных данных (таблица 3), все выделенные грамположительные изоляты сохраняли высокую чувствительность к амоксициллин/клавуланату, цефуроксиму, цефотаксиму, цефепиму, фторхинолонам, амикацину, нитрофурантоину, ванкомицину и линезолиду (83,3–100%). Исключение составили изоляты *E. faecalis*, у которых проявилась природная устойчивость к цефалоспоринам, однако 45,5% изолятов этого вида были чувствительны к цефепиму. Все исследованные штаммы проявили также высокую чувствительность к фосфомицина трометамолу.

Среди стафилококков все штаммы проявили невысокую чувствительность к пенициллинам, цефалексину и цефазолину. Наибольшая резистентность проявилась у *S. aureus*. Устойчивость этих изолятов отмечена к пенициллинам, цефалексину, цефазолину, ципрофлоксацину и гентамицину (только 53,6–66,6% были чувствительны к этим антибиотикам). Высокую активность в отношении данных штаммов сохраняли линезолид, ванкомицин, моксифлоксацин, цефепим, цефотаксим — 100% чувствительность.

Энтерококки характеризовались высокой чувствительностью к ампициллину, ампициллин/сульбактаму, амоксициллин/клавуланату (90,9%). Следовательно, ингибиторозащищенные пенициллины, например, ампициллин/сульбактам, не имеют значимых преимуществ перед ампициллином в антимикробной терапии изолятов *E. faecalis*. Все протестированные фторхинолоны обладали хорошей in vitro активностью в отношении *E. faecalis*. Только 18,9% штаммов были нечувствительны к ципрофлоксацину, а 9,1% штаммов — к офлоксацину, моксифлоксацину, левофлоксацину.

Большинство штаммов *E .faecium* обладали высоким уровнем чувствительности к аминогликозидам гентамицину и амикацину (90,9 и 100,0% соответственно). Не было выявлено устойчивости к ванкомицину, линезолиду и нитрофурантоину.

Таблица 3 — Результаты определения антибиотикочувствительности грамположительных штаммов уропатогенов

| Антимикробные препараты | Количество чувствительных штаммов, % | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *S. saprophyticus*, n=21 | *S. aureus*, n=6 | *S. haemolyticus*, n=9 | *E. faecalis*, n=11 |
| Ампициллин | 73,9 | 66,6 | 77,7 | 90,9 |
| Оксациллин | 73,9 | 66,6 | 77,7 | 54,5 |
| Ампициллин/ сульбактам | 80.9 | 70,8 | 90,9 | 90,9 |
| Амоксициллин/ клавуланат | 85.7 | 83,3 | 100,0 | 90,9 |
| Цефалексин | 80.9 | 53,6 | 55,6 | – |
| Цефазолин | 85.7 | 70,8 | 77,7 | – |
| Цефуроксим | 100,0 | 83,3 | 100,0 | – |
| Цефотаксим | 100,0 | 100,0 | 100,0 | – |
| Цефепим | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 45,4 |
| Офлоксацин | 90,4 | 83,3 | 90,9 | 90,9 |
| Ципрофлоксацин | 85.7 | 66,6 | 90,9 | 81,8 |
| Моксифлоксацин | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 90,9 |
| Левофлоксацин | 95,2 | 83,3 | 90,9 | 90,9 |
| Гентамицин | 85.7 | 66,6 | 90,9 | 90,9 |
| Амикацин | 100,0 | 83,3 | 100,0 | 100,0 |
| Нитрофурантоин | 95,2 | 83,3 | 89,0 | 100,0 |
| Ванкомицин | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Линезолид | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |

**Выводы.** Полученные нами данные показали, что в структуре возбудителей, вызывающих ИМП, значительную роль играет кишечная палочка (69,1%), реже представитель семейства стафилококков — *Staphylococcus saprophyticus* (10,7%), в сумме по удельному весу эти возбудители составляли 79,8% от общего числа идентифицированных штаммов, в 5,6% случаев возбудителем являлся *Enterococcus faecalis*. Остальные уропатогены (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*) составили 14,6% от всех выделенных и идентифицированных изолятов.

Микробиологическая характеристика антибактериальных средств, представленная в этой статье, показывает, что несмотря на возрастающую антибиотикорезистентность уропатогенов, фосфомицина трометамол сохранил высокую активность в отношении большинства грамотрицательных и грамположительных бактерий. Большинство штаммов уропатогенов проявили высокую чувствительность к нитрофуранам, цефалоспоринам III поколения, гентамицину, амикацину, фторхинолонам. Среди указанных препаратов цефалоспорины лишены активности против энтерококков, на долю приходится 5,6% штаммов уропатогенов.

Согласно рекомендациям Европейской ассоциации урологов [10], основным критерием выбора препарата является локальная эпидемиология антибиотикорезистентности уропатогенных штаммов (чувствительность не менее 90%). Исходя из наших данных, наиболее эффективными антимикробными препаратами для грамотрицательных уропатогенов являются фосфомицина трометамол, нитрофурантоин, фторхинолоны, для грамположительных — цефотаксим, цефепим, моксифлоксацин, ванкомицин, линезолид.

**Литература**

1. Страчунский, Л.С. Антибактериальная терапия: практ. Рук-во / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М.: РЦ «Фармединфо», 2000. — 191 с.
2. Практические подходы к выбору антибиотиков при неосложненных инфекциях мочевыводящих путей / Л.С. Страчунский [и др.] // Урология. — 2002. — № 2. — С. 8–14.
3. Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению. — Минск, 2010. — 123 с..
4. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: инструкция по применению. — Минск, 2008. — 83 с.
5. Лоран, Б. Роль урогенитальных инфекций в этиологии цистита и необструктивного пиелонефрита у женщин / Б. Лоран, Л.А. Синякова, И.В. Косова // Урология. — 2005. — № 2. — С. 74–79.
6. Палагин, И.С. Выбор антимикробных препаратав при острых неосложненных циститах / И.С. Палагин // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. — 2009. — Т. 11, № 4. — С. 228–334.
7. Титов, Л.П. Стратегии контроля резистентности микроорганизмов к антибиотикам: международный и национальный опыт / Л.П. Титов, В.И. Ключенович // Материалы междунар. науч.-практ. конф. «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам», Минск, 27–28 мая 2003 г. — Минск, 2003. — С. 4–13.
8. Fluit, A.C. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care unit of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRE antimicrobial surveillance Program 1997–1998 // A.C. Fluit, J. Verhoef, F.J. Schmitz // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 20. — P. 617–625.
9. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) / D.J. Brown [et al.] // J. Antimicrob. Chemoth. — 2005. — Vol. 56. — P. 1000–1018.
10. Рекомендации Европейской ассоциации урологов по лечению инфекций мочевыводящих путей и инфекций репродуктивной системы у мужчин / К. Набер [и др.] // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотерапия — 2002. — Т. 4, № 4. — С. 347–363.

## CHARACTERISTICS OF BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE OF COMMUNITY-ACQUIRED DISEASES WITH URINARY TRACT ORIGIN

**Gorbunov V.A., Ermakova T.S., Titov L.P., Vinnichak L.A., Dashukevich L.I.**

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

Urinary tract infections are the most common infectious diseases in outpatient urological practice. The major pathogens are gram-negative aerobic bacteria, the leading agent is *E. coli*. However, gram-negative bacteria (*Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*) and gram-positive cocci (staphylococci and enterococci) also play an important role in development of these diseases. The article shows a detailed analysis of the most numerous group of antibacterial drugs and their antimicrobial activity towards the pathogens.

Поступила 02.09.2013

## МОНИТОРИНГ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ СРЕДСТВАМ КАК ЭЛЕМЕНТ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА И КЛЮЧЕВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ЕВРОПЕЙСКОГО СТРАТЕГИЧЕСКОГО ПЛАНА ДЕЙСТВИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ

**Титов Л.П.[1], Горбунов В.А.[1], Давыдов А.В.[1], Ермакова Т.С.[1], Лебедев Ф.А.[1], Левшина Н.Н.[2], Карабан И.А.[3]**

*[1]Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Минский городской центр гигиены и эпидемиологии;*

*[3]Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Инициация Европейским региональным комитетом ВОЗ Европейского стратегического плана действий по проблеме устойчивости к антибиотикам, а также другие усилия Всемирной организации здравоохранения нашли быструю реализацию основных положений плана в Республике Беларусь, что послужило основой плодотворного сотрудничества в данном вопросе. Была разработана национальная стратегия борьбы с распространением резистентных форм микроорганизмов, которая предполагает помимо прочего также функционирование системы мониторингаре-

зистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам как элемента системы эпидемиологического надзора на всех уровнях — лечебно-профилактических учреждений, региональном и национальном.

**Ключевые слова:** антибиотики, устойчивость, мониторинг, WHONET,эпиднадзор.

**Введение.** Проблема распространения резистентности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам является хорошо известной среди специалистов в области здравоохранения, исследуется и обсуждается с 60-х гг. XX в. Однако, на протяжении последних нескольких лет данному вопросу уделяется особо пристальное внимание как на уровне европейского региона, так и непосредственно в локальной системе здравоохранения Республики Беларусь. На международной арене ключевым игроком в борьбе с распространением антимикробной резистентности (АМР) является направляющая и координирующая инстанция в области здравоохранения — Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Призывы к действиям по борьбе с АМР содержались как минимум в нескольких резолюциях Всемирной ассамблеи здравоохранения (1984, 1998, 2001), а в 2001 г. ВОЗ опубликовала глобальную стратегию по сдерживанию устойчивости к антимикробным средствам, и уже тогда ситуация была охарактеризована как глобальный кризис в здравоохранении. В 2011 г. Всемирный день здоровья 7 апреля был посвящен проблеме АМР и прошел под лозунгом «Не принять меры сегодня — нечем будет лечить завтра».

Немного позже, в сентябре этого же года в г. Баку (Азербайджан) на 61-й сессии Европейского регионального комитета ВОЗ был предложен и принят Европейский стратегический план действий по проблеме устойчивости к антибиотикам, подержанный и Республикой Беларусь [1, 2]. План содержал общие цели, которые ставятся в целом перед регионом, и которые направлены на предотвращение, борьбу и сдерживание роста устойчивости к антибиотикам:

• сокращение заболеваемости, смертности, затрат, связанных с АМР;

• содействие созданию и реализации национальных планов действий;

• содействие рациональному использованию антибиотиков и осуществлению мер инфекционного контроля в лечебных учреждениях;

• содействие рассмотрению вопросов взаимосвязи АМР и использования антибиотиков у людей и животных;

• осуществление эффективной политики в сфере обучения рациональному использованию антибиотиков на медицинском, ветеринарном и биологическом факультетах;

• повышение осведомленности о проблеме АМР, а также об отсутствии эффективных антибиотиков для лечения жизнеугрожающих инфекций;

• создание механизмов финансирования и маркетинга с целью разработки новых лекарственных средств;

• привлечение специалистов к действиям на всех уровнях по предупреждению инфекционных заболеваний и сокращению потребности в назначении антибиотиков).

Для достижения поставленных целей было сформулировано семь стратегических (основных) задач, предложенных для проведения правительствам и заинтересованным сторонам отдельных стран и направленных на самые сложные факторы и механизмы формирования антимикробной резистентности. Данные цели учитывают многие аспекты АМР (технический и финансовый, регламентационный, образовательный и поведенческий), поскольку проблема является межотраслевой, или даже всеобъемлющей, и для своего решения требует непосредственного участия специалистов из разных областей. Таким образом, европейский стратегический план действий стал базисом для разработки всеобъемлющих и подробных национальных планов, установления руководящих принципов, регламентов и внедрения организационных мер, направленных на реализацию таких планов. В целом стратегические цели постулируют необходимость более глубокого изучения причин наблюдаемых высоких уровней АМР клинически значимых микроорганизмов, улучшения оснащения лабораторий и повышение квалификации специалистов для повышения качества исследований, налаживание мониторинга и эпидемиологического надзора, а также взаимосвязи с международными системами и сетями по проблеме антимикробной устойчивости к антибиотикам и их потребления. Именно взаимосвязь локальных и международных систем мониторинга и эпиднадзора, которая должна заключаться, прежде всего, в передаче статистической информации и данных, является первостепенной, поскольку в условиях современной глобализации распространение устойчивых вари-

антов микроорганизмов происходит весьма высокими темпами. При таком положении вещей усилия многих стран осуществляющих мероприятия по надзору за АМР могут быть сведены к минимуму из-за отсутствия контроля и/или бездействия на одной или нескольких территориях. По этой причине, все национальные системы мониторинга и эпиднадзора в странах не только должны четко функционировать на местном уровне, а также должны быть объединены воедино для работы на новом качественной уровне в рамках единой международной системы по надзору за антимикробной резистентностью. Только обладая такой системой и, соответственно, владея достоверной информацией о слабых местах по всем регионам, общество будет способно эффективно бороться с проблемой АМР на всех уровнях и направлениях, особенно там, где это необходимо в первую очередь.

**Основная часть.** Одной из стратегических целей Европейского стратегического плана действий по проблеме устойчивости к антибиотикам [1, 2], которую эксперты поставили на второе место, является совершенствование системы эпидемиологического надзора за антимикробной резистентностью. Предполагается, что функционирующая в каждом государстве национальная система эпиднадзора должна обеспечивать сбор, анализ и дальнейшее представление достоверных данных об уровнях и динамике резистентности возбудителей, выявлении ранее не встречающихся фактов устойчивости. При этом первостепенным является качественное выполнение лабораторных диагностических исследований разнообразного биологического материала, точная идентификация микроорганизмов, определение и интерпретация результатов чувствительности культур бактерий. Полная первичная информация из микробиологических лабораторий больниц, поликлиник, медицинских центров, центров гигиены и эпидемиологии, лабораторий научно-исследовательских центров, то есть фактически из всех функционирующих в стране лабораторий должна поступать в национальный референс-центр. Для осуществления сбора и анализа данных ВОЗ рекомендует использовать программу WHONET, а также периодически передавать данные в региональные и международные сети по надзору за антимикробной резистентностью, такие как CAESAR, TESSy и EARS-Net. Так, например, Европейская сеть по надзору за устойчивостью к антимикробным средствам (EARS-Net) с 1999 г. проводит сбор данных из 29 стран европейского региона в отношении семи наиболее значимых возбудителей (*Streptococcuspneumoniae*, *Staphylococcusaureus*, *Escherichiacoli*, *Enterococcusfaecalis*, *Enterococusfaecium*, *Klebsiellapneumoniae* и *Pseudomonasaeruginosa*). Национальные системы эпиднадзора этих стран регулярно осуществляют сбор данных из соответствующих лабораторий и передают их в сеть. Так, общее число объединенных в EARS-Net лабораторий в настоящее время превышает 900, причем обслуживают они около 1400 больниц или около 100 млн человек. Создаваемая в результате база данных, которая к настоящему времени уже содержит сведения о более чем 400 тыс. инвазивных изолятах, позволяет вычленить не только данные и динамику резистентности по странам, а также получить сопоставимые данные по большей части европейского региона. Отчеты об уровнях резистентности публикуются ежегодно, а доступ к данным за предыдущие годы можно получить на веб-сайте проекта. Например, на рисунке 1 приведены уровни метициллин резистентных инвазивных штаммов *Staphylococcusaureus*, выделенных от пациентов в 2011 г. во всех участвующих в проекте странах (в скобках после названия страны приведено общее число выделенных изолятов) [2]. На рисунке 2 изображена картограмма, отражающая распределение уровней выделенных в 2011 г. метициллин резистентных инвазивных штаммов *Staphylococcusaureus* по странам Европы [2].

Также с помощью EARS-Net сведения об уровнях устойчивости можно просмотреть в виде таблиц по любым возбудителям и странам за любой период времени. Например, в таблице отражено количество и уровни устойчивости инвазивных штаммов *Staphylococcusaureus* к рифампицину, выделенных в Германии и Польше за 2009–2011 гг. [2].

Из представленных данных хорошо видно, что уровни устойчивости инвазивных штаммов золотистого стафилококка к рифампицину в 2011 г. в Польше не только значительно превышают таковые в Германии (27,4 vs 0,7%, $p<0,01$), но и имеют четкую тенденцию к увеличению по сравнению с 2009 г. (27,4 vs 1,2%, $p<0,01$). Подобные сведения являются очень важным источником информации по проблеме АМР для правительств, врачей, ученых и широкой общественности. Эти сведения важны и необходимы специалистам в области здравоохранения для координации действий и принятия решений в борьбе с антимикробной резистентностью.

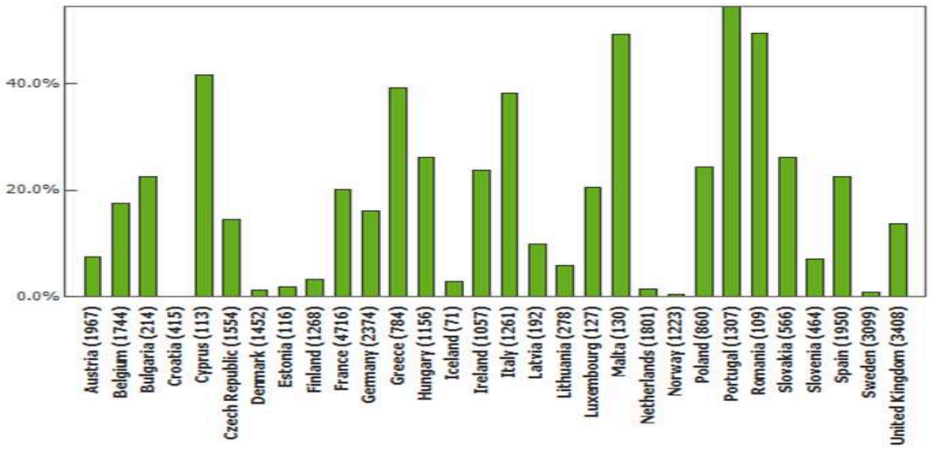



Рисунок 1 — Доли метициллин резистентных инвазивных штаммов *Staphylococcusaureus* в странах Европы в 2011 г.

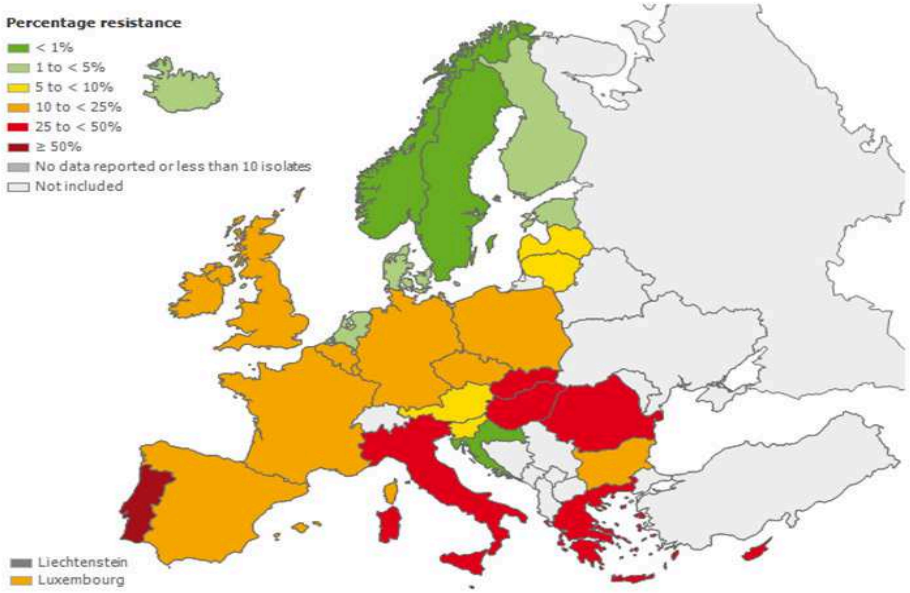



Рисунок 2 — Уровни метициллин резистентных инвазивных штаммов *Staphylococcusaureus* в странах Европы в 2011 г.

Таблица — Количество и уровни устойчивости инвазивных штаммов *Staphylococcusaureus* к рифампицину, выделенных в Германии и Польше за 2009–2011 гг. (S — устойчивый, I — умеренно устойчивый, R — резистентный штамм)

| Страна | Год | Число штаммов | | | | Уровни устойчивости, % | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | S | I | R | Всего | S | I | R |
| Германия | 2009 | 1144 | 2 | 6 | 1152 | 99,3 | 0,2 | 0,5 |
| | 2010 | 1294 | 0 | 9 | 1303 | 99,3 | 0,0 | 0,7 |
| | 2011 | 1642 | 3 | 11 | 1656 | 99,2 | 0,2 | 0,7 |
| Польша | 2009 | 255 | 1 | 3 | 259 | 98,5 | 0,4 | 1,2 |
| | 2010 | 211 | 0 | 2 | 213 | 99,1 | 0,0 | 0,9 |
| | 2011 | 91 | 7 | 37 | 135 | 67,4 | 5,2 | 27,4 |

Рассматривая ситуацию по антимикробной резистентности в Беларуси, важно отметить, что данная проблема никогда не оставалась незамеченной специалистами из нашей страны. Еще в 2003 г. на базе Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Мини-

стерства здравоохранения (теперь Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии) был создан референс-центр мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов, задачей которого является микробиологический мониторинг за резистентностью клинически значимых микроорганизмов к антимикробным средствам и организационно-методическое руководство по проблеме АМР. Начиная с того времени координационные связи между клиниками, микробиологическими лабораториями, лабораториями центров гигиены и эпидемиологии и референс-центром начинали налаживаться и только укреплялись. Были отработаны критерии подготовки формуляров, ротации неэффективных препаратов, подготовлены протоколы антибактериальной терапии, а также постоянно собирались данные о спектре и объемах применяемых антибактериальных средств. Было обеспечено динамическое наблюдение за уровнями резистентности микроорганизмов к используемым препаратам в отдельных учреждениях здравоохранения, регионах и целой стране [3].

Во время рассмотрения и принятия в сентябре 2011 г. Европейского стратегического плана действий по проблеме устойчивости к антибиотикам Беларусь также выразила свое непосредственное желание участвовать в его реализации. Понимая важность и масштабность данной проблемы, Министерство здравоохранения выдвинуло предложение о принятии двухстороннего соглашения о сотрудничестве с Европейским региональным бюро ВОЗ, которое было поддержано и другой стороной.

В апреле 2012 г. по поручению Министерства здравоохранения на базе Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии был проведен республиканский научно-практический семинар «Формирование системы мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам в организациях здравоохранения» для представителей управлений здравоохранения, центров гигиены и эпидемиологии, специалистов по лабораторной диагностике и инфекционным заболеваниям, госпитальных эпидемиологов и клинических фармакологов из всех регионов страны. Целью данного семинара было ознакомление ответственных лиц с задачами Европейского стратегического плана действий, национальной стратегии борьбы с распространением резистентных форм микроорганизмов, а также с программой WHONET и планом ее внедрения и применения в учреждениях страны.

К моменту организации семинара, в марте 2012 г. в стране на законодательном уровне уже была закреплена необходимость в обязательном порядке проведения соответствующего мониторинга — инструкция о порядке проведения мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам в организациях здравоохранения. В соответствии с ней, мониторинг осуществляется на трех уровнях: республиканском, региональном (на уровне административной территории) и локальном (на уровне организации здравоохранения). Определен перечень отделений, в которых осуществляется мониторинг за антибиотикорезистентностью по конкретных видам микроорганизмов, список которых может быть расширен. Организациям здравоохранения следует анализировать спектр выделяемой в отделениях микрофлоры, а также уровни ее чувствительности к противомикробным средствам. Необходимо регулярно проводить анализ использования антибиотиков как в целом по учреждению, так и в конкретном отделении, с целью своевременной коррекции структуры закупаемых и используемых препаратов в соответствии с их эффективностью для лечебных или профилактических целей. Также предписано регулярно обновлять формуляры для эмпирической и специфической терапии, а также предоперационной химиопрофилактики. Такой анализ должен проводиться квалифицированными специалистами (эпидемиологами, микробиологами, фармакологами) совместно с сотрудниками территориальных центров гигиены и эпидемиологии не реже 1 раза в год.

Не менее важным аспектом, будь то лаборатория в больнице или в центре гигиены и эпидемиологии, является внутренний и внешний контроль качества микробиологических исследований. Соответствие их международным рекомендациям, критериев оценки и интерпретации результатов, современных технологии идентификации микроорганизмов и определения антибиотикорезистентности (диско-диффузионный метод, разведения в плотной или жидкой питательной среде, полоски с нанесенным градиентом концентрации антибиотика), либо с использованием бактериологических анализаторов. В 2013 г. четыре бактериологические лаборатории: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минского городского центра гигиены и эпидемиологии, Минской детской городской ин-

фекционной больницы и Гродненской областной больницы участвовали в системе внешнего контроля качества бактериологических исследований, проводимых Национальным институтом здоровья Южной Африки.

В рамках соглашения о сотрудничестве в начале июня 2012 г. миссия Европейского регионального бюро ВОЗ посетила Беларусь с целью оценки ситуации в стране по вопросам контроля и предупреждения распространения антимикробной резистентности в учреждениях здравоохранения. Работу миссии возглавил руководитель программы Евробюро ВОЗ д-р Данило Ло Фо Вонг, в неё также входили д-р Ниенкеван де Санде — сотрудник Евробюро ВОЗ, д-р Оскар Экелунд — клинический микробиолог (Швеция) и мистер Джос Монен — международный менеджер центра сбора и обработки данных о резистентности микроорганизмов в странах европейского союза, представляемых в единый аналитический центр (Институт общественного здоровья в Нидерландах, г. Билтховен). Миссия ВОЗ оценивала положение дел в Беларуси по профилактике и борьбе с антимикробной резистентностью посредством мер эпидемиологического надзора, рационального использования антибиотиков и инфекционного контроля в учреждениях здравоохранения в разрезе всех стратегических направлений Европейского стратегического плана действий. Специалисты посетили ряд учреждений Министерства здравоохранения — РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минский городской центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, 10-ю городскую клиническую больницу, РНПЦ детской онкогематологии, Минскую городскую инфекционную больницу и поликлинику №10. Эксперты Европейского регионального бюро ВОЗ отметили высокое качество диагностики и хорошее материально-техническое оснащение лабораторий. В лабораториях республиканского и городского уровня имелись соответствующие протоколы, работа осуществляется современными методами и с использованием нового оборудования, что позволяет своевременно получать достоверную информацию о возбудителях, уровне чувствительности их к антибактериальным препаратам. Было отмечено, что в практику учреждений здравоохранения и бактериологических лабораторий внедряются компьютерные технологии сбора и анализа данных о резистентности бактерий от пациентов с разной патологией, особенно с инвазивными формами заболеваний (бактериемия, сепсис, менингиты и др.). Все это говорит о правильной тенденции по внедрению международных стандартов надлежащей лабораторной практики в нашей стране. Обобщая результаты работы эксперты ВОЗ обнаружили много положительного касательно ситуации в стране на тот момент, а также высказали предложения, способствующие улучшению ситуации и ограничивающие распространение резистентности, повысят безопасность населения и пациентов, обеспечат доступность и эффективность терапии антибиотиками путем оптимизации их назначения на основе качественной бактериологической диагностики.

В конце марта 2013 г. Республиканским научно-практическим центром эпидемиологии и микробиологии совместно с Минским городским центром гигиены и эпидемиологии был организован и проведен еще один научно-практический семинар «Оптимизация использования программы WHONET в системе мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным препаратам в организациях здравоохранения». Участие в семинаре приняли д-р Джон Стиллинг, директор центра ВОЗ по надзору за антимикробной резистентностью и разработчик программы WHONET, а также д-р Джос Монен, куратор международной базы данных CAESAR (Сеть по надзору за антимикробной резистентностью в Центральной Азии и Восточной Европе). Общение участников из всех регионов страны с автором программы WHONET позволило подробно обсудить практические вопросы использования системы для сбора данных, импорта данных из бактериологических анализаторов и экспорта данных в референс-центр и международные базы данных. Джос Монен в свою очередь поделился опытом проведения мониторинга резистентности в Европе, представил проект ВОЗ по надзору за антимикробной резистентностью в Центральной Азии и Восточной Европе (CAESAR), а также обсудил технические вопросы передачи информации в CAESAR с национальным координатором по вопросу AMP и кураторами национальной базы данных.

Вместе с тем, наш многолетний опыт построения национальной системы мониторинга резистентности показывает, что еще далеко не все учреждения здравоохранения смогли включиться в решение данной проблемы и эффективно наладить мониторинг резистентности микроорганизмов к противомикробным средствам. К настоящему времени, только небольшая часть лабораторий способна представить в референс-центр адекватную и достоверную информацию в виде электронных

баз данных о выделяемых микроорганизмах и уровнях их чувствительности: менее половины лабораторий на районном уровне, и не все лаборатории на уровне областном. Поэтому в ближайшее время (до конца 2013 г.) руководителям учреждений здравоохранения (больниц, поликлиник, центров гигиены и эпидемиологии) по данной проблеме необходимо:

• внедрить в повседневную работу лабораторий и учреждений здравоохранения рекомендованную ВОЗ и утвержденную приказом Министерства здравоохранения информационную систему WHONET с внесением в нее всех полученных в ходе исследований данных;

• использовать в практике современные методы определения резистентности бактерий к антибиотикам — диско-диффузионный метод, разведения в питательной среде, полоски с нанесенным градиентом концентрации антибиотика, либо биологические анализаторы (Vitek2, BacT/ALERT), индикацию бета-лактамаз;

• руководствоваться в работе системой предельных значений EUCAST как для диаметров зоны подавления роста микроорганизмов, так и для минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков;

• регулярно предоставлять информацию о мониторинге резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам в виде электронных баз данных WHONET в референс-центр.

В ситуации, когда не все лаборатории передают в референс-центр информацию о выделяемых микроорганизмах и уровнях их устойчивости, либо искажают ее, затруднено полноценное функционирование системы мониторинга резистентности, особенно на республиканском уровне. На рисунке 3 отражена принципиальная организационная структура системы мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам. Отсутствие сведений по целым регионам приводит к отсутствию картины по стране в целом, что затрудняет проведение сравнительного анализа данных и коррекции национальной стратегии борьбы с лекарственной устойчивостью, а также передачу адекватных данных в сеть CAESAR. Только общими силами при принятии достаточных усилий всеми руководителями учреждений здравоохранения, центров гигиены и эпидемиологии, заведующими микробиологических лабораторий возможно установление полной и должным образом функционирующей системы мониторинга.

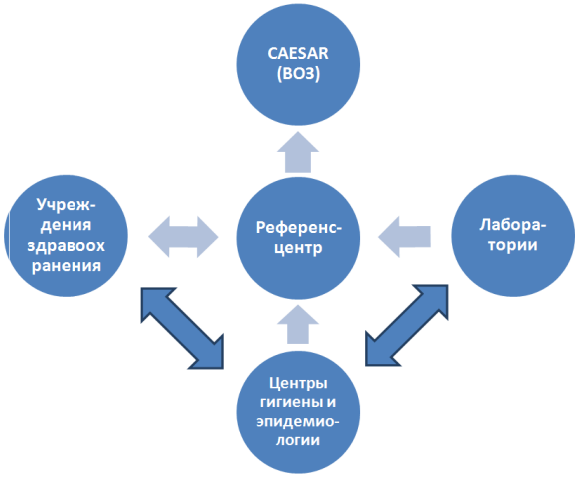



Рисунок 3 — Организационная структура национальной системы мониторинга резистентности микроорганизмов в системе здравоохранения

При формировании республиканской базы данных WHONET, а точнее при сборе данных из отдельных лабораторий и обобщении их воедино, мы столкнулись со многими трудностями, которые представляют собой:

• невысокий уровень технического оснащения лабораторий компьютерной техникой, особенно в тех лабораториях, где проводится работа с базами данных внушительных размеров (референс-центр РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минский городской центр гигиены и эпидемиологии).

• недостаток квалифицированных специалистов на местах, способных одновременно как работать с компьютером и программой WHONETна высоком уровне, так и владеть достаточными знаниями в области микробиологии.

• частая невнимательность при внесении информации в базу данных и отсутствие проверки данных после внесения, что приводит к достаточному количеству ошибок, которые, все же, при формировании республиканской базы данных приходится исправлять (использование неверной раскладки клавиатуры, внесение данных в другие поля, внесение бессмысленных и нереалистичных данных).

• использование неверной конфигурации лаборатории, а именно антибиотиков (выбор дисков с неверной концентрацией антибиотика, использование не рекомендованных антибиотиков, использование не рекомендованных стандартов, отличных от EUCASTи CLSI, внесение значений минимальной ингибирующей концентрации МПК (MIC) в поля для диско-диффузионного метода).

• внесение не всей необходимой информации (часто отсутствует дата взятия материала – specimendate, пол, возраст пациента, отсутствует уникальный номер пациента, или хотя бы, номер пробы; вносится информация не по всем применяемым в лабораториях методах определения чувствительности, либо не по всем выполненным исследованиям).

К настоящему времени база данных референс-центра мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов включает в себя 268258 записей, из которых 85919 (32,03%) соответствует исследованиям с отсутствием роста микроорганизмов, 16479 (6,14%) — с обнаружением нормальной микрофлоры, 165860 (61,83%) — с обнаружением патогенных или условно-патогенных микроорганизмов.

Так, среди результативных исследований имеется информация о 3138 (1,89%) инвазивных изолятах, выделенных из крови или спинномозговой жидкости. Но все же наибольшее число приходится на изоляты, выделенные из цервикального канала (22467, 13,55%) и влагалища (22918, 13,82%). Общее количество изолятов в зависимости от источника их выделения отражено на рисунке 4.

Рассматривая состав выделяемой в лабораториях страны патогенной и условно патогенной микрофлоры, очевидно, что наибольшее число исследований (27564, 16,62%) соответствует обнаружению эпидермального стафилококка (*S.epidermidis*), а также золотистого стафилококка (20568, 12,40%) и кишечной палочки (20139, 12,14%).Общее число выделенных в представивших информацию лабораториях изолятов отдельных видов отражено на рисунке 5.

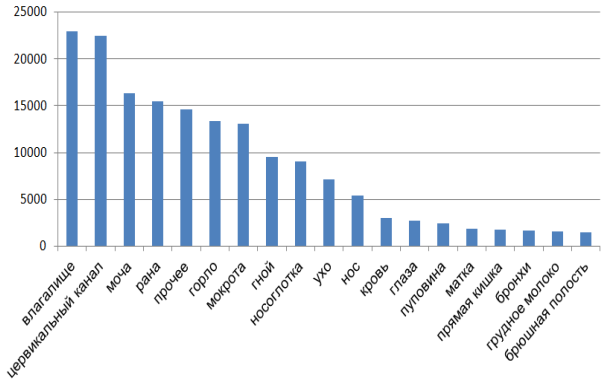



Рисунок 4 — Общее количество изолятов базы данных референс-центра в зависимости от источника их выделения

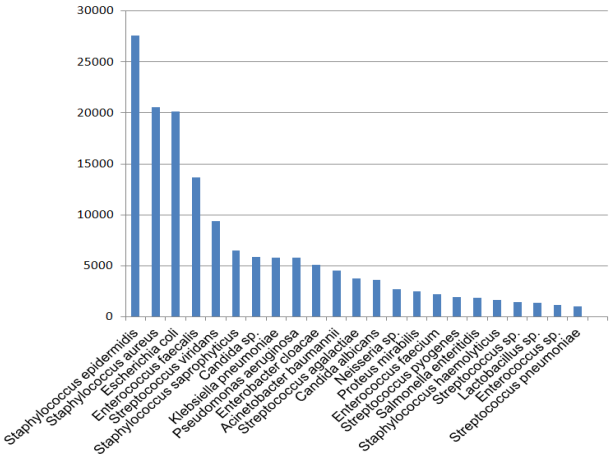



Рисунок 5 — Общее число выделенных изолятов отдельных видов (по данным республиканской базы данных)

Оценивая вклад лабораторий в формирование национальной базы данных следует отметить, что наибольшее число результатов (207706, 77,43%) приходится на лабораторию Минского городского центра гигиены и эпидемиологии. Это связано, прежде всего, с мощностью лаборатории, а также с тем, что использование программы WHONETв ней началось значительно раньше, чем это было предписано для всей страны. Кроме того, большой объем информации поступил из Городской детской инфекционной клинической больницы г. Минска — 21091, что составило 7,86%.

Структура республиканской базы данных по представившим информацию лабораториям отражена на рисунке 6.

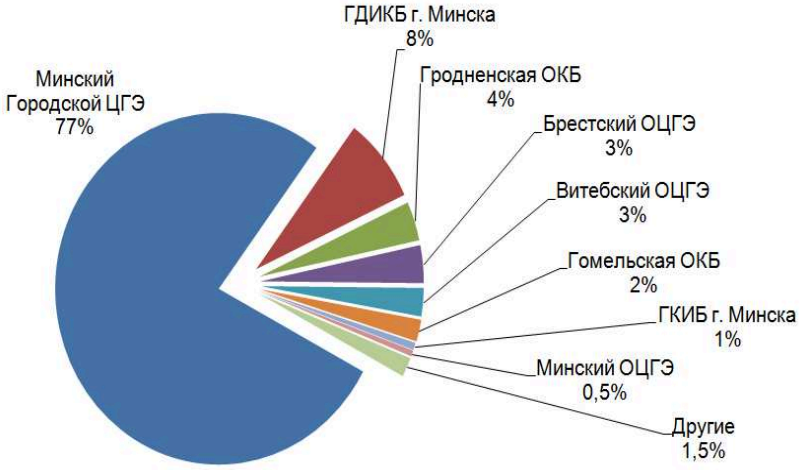



Рисунок 6 — Структура базы данных республиканского референс-центра мониторинга резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов по представившим информацию лабораториям

Как видно из рисунка 6баклабораториям областных центров гигиены и эпидемиологии, равно как и баклабораториям крупных лечебных учреждений в 2013–2014 гг. необходимо существенно увеличить долю информации о резистентности изолятов в национальной базе данных АМР.

Следующим этапом в функционировании национальной системы мониторинга резистентности и развития международного сотрудничества является передача информации в Сеть по надзору за антимикробной резистентностью в Центральной Азии и Восточной Европе (CAESAR). В эту систему экспортируются данные только об инвазивных изолятах, выделенных из крови или спинномозговой жидкости, устойчивых к определенным антибиотикам и относящихся к *S.pneumoniae*, *S.aureus, E.coli, E.faecalis, E.faecium, K.pneumoniae и Acinetobacterspp.* Так, на основе данных республиканской базы 2011–2012 гг., в сеть CAESARотобраны сведения о 943 таких изолятов с более чем 14 тыс. фактов устойчивости к антибиотикам (в среднем, по 14 фактов резистентности для каждого изолята). Статистические данные о выделенных в стране изолятах свидетельствуют о высоком уровне метициллин резистентного золотистого стафилококка (106 из 254 изолятов, 42%), а также энтеробактерий с бета-лактамазами расширенного спектра (на основании данных о чувствительности к цефтазидиму, цефотаксиму и цефтриаксону): кишечной палочки — 49 из 64 изолятов (77%) и клебсиеллы пневмонии — 128 из 143 изолятов (90%).Следует отметить, что наибольший уровень метициллин резистентного золотистого стафилококка наблюдается среди изолятов, выделенные из дыхательных путей (верхние дыхательные пути — 90,0%, бронхи — 61,0%) и плевральной жидкости (75,9%), а наименьший — из матки (13,0%) и носоглотки (19,6%). Уровни метициллин резистентных штаммов золотистого стафилококка в зависимости от источника выделения представлены на рисунке 7.

**Заключение.** Рассмотрев этапы становления существующей национальной системы мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам в организациях здравоохранения можно сделать следующие выводы:

• национальная система мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам существовала в стране давно, однако после принятия Европейским региональным комитетом ВОЗ Европейского стратегического плана действий по проблеме устойчивости к антибиотикам, система начала значительно совершенствоваться, приняла нормативный характер;

• построенная к настоящему времени система имеет все предпосылки и основы для четкого функционирования, которое может быть налажено только в случае заинтересованного участия всех вовлеченных лиц.

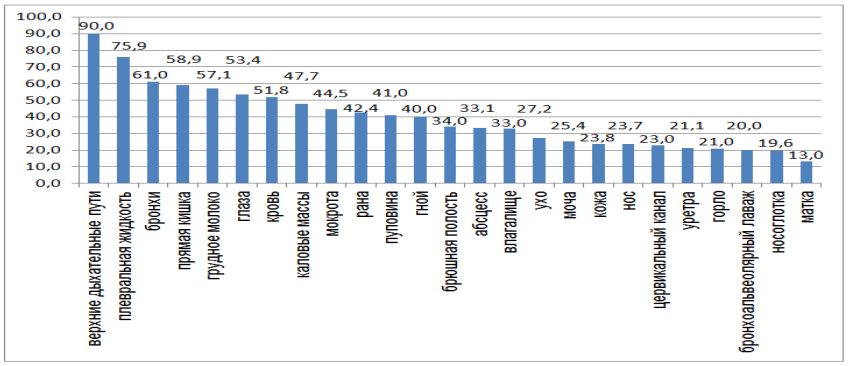



Рисунок 7 — Уровни метициллин резистентных штаммов *Staphylococcusaureus* в зависимости от источника выделения (по сведениям базы данных национального референс-центра)

**Литература**

1. Европейский стратегический план действий по проблеме устойчивости к антибиотикам. – EUR/RC61/14. – Всемирная организация здравоохранения, Европейский региональный комитет, 61-я сес., Баку, Азербайджан, 2011.

2. European strategic action plan on antibiotic resistance. — EUR/RC61/14 / World Health Organization, Regional Committee for Europe, Sixty-first session, Baku, Azerbaijan, 2011.

3. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [Electronic resource] / European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2005–2013. – Stockholm, Sweden. — Mode of access : http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-net/database/Pages/database.aspx. — Date of access : 09.09.2013.

4. Горбунов, В., Титов Л. Национальная стратегия против устойчивых микроорганизмов / В. Горбунов, Л. Титов // Мед. вестн. — 2012. — № 51 (1094).

## MONITORINGOF ANTIMICROBIAL RESISTANCEAS THE ELEMENT OF THESURVEILLANCE SYSTEM AND THE KEYDIRECTION OF THEEUROPEANSTRATEGIC ACTION PLAN UPONTHE PROBLEM

**Titov L.P.[1], Gorbunov V.A.[1], Davydov A.V.[1], Ermakova T.S.[1], Lebedev F.A.[1], Levshina N.N.[2], Karaban I.A.[3]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology;*

*[3]Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus*

Initiation bythe WHO Regional Committee for Europeof the Europeanstrategic action plan onantibiotic resistance, as well as othereffortsof the WorldHealth Organizationfound theimmediate implementation ofkeypoints of the planin the Republicof Belarus, whichwas the basisof the fruitful cooperationin this matter.

A nationalstrategy to control the spreadof resistantmicroorganisms was developed and implemented. The strategy defines the functioningof the monitoring resistance systemtoantimicrobialsas part ofthe surveillance systemat alllevels: hospitals, regional and national levels.

**Keywords;** antimicrobials, resistance, WHONET, surveillance, AMR.

Поступила 02.09.2013

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ИНДИКАЦИИ КИШЕЧНЫХ ВИРУСОВ В ОБЪЕКТАХ ПИТЬЕВОГО ВОДОСНАБЖЕНИЯ

**Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», Минск, Беларусь*

**Резюме.** Разработаны праймеры и гибридизационные зонды для индикации норо- и энтеровирусов методом ПЦР в реальном времени с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. Экспери-

ментально отобраны по две системы праймеров и зондов для индикации норо- и энтеровирусов, которые работают в одинаковых условиях. Данные праймеры и зонды будут использоваться в качестве основы при создании коммерческого препарата для экспресс-индикации вирусных патогенов в объектах питьевого водоснабжения.

**Ключевые слова:** энтеровирусы, норовирусы, вирусные инфекции, диагностика, полимеразная цепная реакция.

**Введение.** Контроль качества питьевой воды по вирусологическим показателям с последующей оценкой ее безопасности в отношении патогенных для человека вирусов имеет приоритетное значение в общей системе эпидемиологического надзора за вирусными инфекциями [1, 2]. Эффективность такого контроля напрямую зависит от уровня и аналитической чувствительности используемых лабораторных методов и технических средств. Необходимым условием при выборе подходящих методов исследования проб воды является (кроме высокой чувствительности и специфичности) возможность их применения для индикации нецитопатогенных вирусов, не способных культивироваться в клеточных культурах. Указанным требованиям полностью соответствуют методы ПЦР-анализа. Поэтому совершенствование и оптимизация ПЦР-технологий для выявления водных вирусных патогенов является актуальным и перспективным направлением исследований, направленным на совершенствование и повышение качества и эффективности лабораторного контроля над эпидемически значимыми водными объектами. Данный контроль вследствие большой трудоемкости и существенных материальных затрат, как привило, осуществляется в отношении весьма ограниченного перечня вирусов-контаминантов воды. К ним прежде всего относятся энтеровирусы как регламентируемые индикаторы вирусного загрязнения водной среды, а также возбудители других актуальных вирусных инфекций человека с водным путем передачи. Среди последних особое место занимают норовирусы, которые считаются одними из основных доминирующих этиологических агентов вспышек острых кишечных инфекций и гастроэнтеритов водного происхождения.

**Целью** исследования была разработка набора праймеров и зондов для ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов в реальном времени для идентификации эпидемически значимых возбудителей водных вирусных инфекций (энтеро- и норовирусов).

**Материалы и методы.** В качестве модельного объекта культивируемых вирусов был использован штамм ECHO 30 1260 из музея РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

В качестве модельного объекта некультивируемых вирусов была использована смесь норовирусов из образцов клинического материала (рег. №№ ё7964-7974) лаборатории санитарной вирусологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «РЕВЕРТА», производства «Амплисенс» (Россия).

Амплификацию полученной в реакции обратной транскрипции кДНК осуществляли с использованием реактивов фирмы «Праймтех» (РБ).

Выделение РНК из проб проводили с помощью набора «Рибосорб» производства «Амплисенс» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), TRI-reagent (Sigma), QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) в соответствии с инструкциями производителей.

**Результаты и их обсуждение.** Как известно, для энтеро- и норовирусов характерна высокая вариабельность геномов, что существенно затрудняет их индикацию молекулярно-генетическими методами. Для данных вирусных агентов уровень генетических различий внутри рода крайне высок и очень незначительная часть генома обладает достаточной степенью консервативности в пределах рода для того, чтобы служить мишенью в амплификации. В связи с этим на первом этапе исследований были построены полногеномные выравнивания и определены участки с достаточной степенью консервативности, внутри которых в дальнейшем осуществлялся поиск минимально вырожденных праймеров. Минимизация вырожденности была одним из определяющих условий, т. к. известно, что праймеры с высокой вырожденностью обладают достаточно низкой чувствительностью (за счет малой доли специфического праймера, содержащегося в смеси, которую представляет собой вырожденный праймер).

В результате выравнивания 80 полногеномных нуклеотидных последовательностей норовирусов, принадлежащих к различным генотипам (с 1 по 17) в пределах II геногруппы, установлено, что достаточной степенью консервативности для поиска праймеров и зондов для ПЦР обладает только фрагмент генома с 4984 по 5107 н. о. протяженностью 123 п. о. В пределах этого участка

максимальная доля нуклеотидных различий между последовательностями составила 15%. В результате автоматического (программами Primer Premier, Genamix Expression) и ручного поиска было выбрано 17 олигонуклеотидных последовательностей для норовирусов и установлены их основные характеристики.

Аналогичные исследования были проведены в отношении энтеровирусов. Построены 2 выравнивания. Одно из них включало 107 наиболее распространенных серотипов рода Энтеровирус, второе — 4 консенсусные последовательности вирусов, принадлежащих к видам Human Enterovirus A, B, C и D. На основании этих выравниваний определен наиболее консервативный фрагмент генома энтеровирусов, который включал участок генома с 467 по 584 н.о. Поиск праймеров осуществлялся внутри данного фрагмента с использованием тех же программных средств, что и при подборе норовирусных праймеров. В результате были выбраны 18 олигонуклеотидов. После сравнения характеристик выбрано 3 прямых праймера, 1 зонд и 2 обратных праймера для норовирусов (таблица 1) и 2 прямых праймера, 3 зонда и 1 обратный праймер для энтеровирусов (таблица 2), которые были синтезированы для последующей экспериментальной оценки их свойств, сравнения и возможного использования для производства соответствующих диагностических и санитарно-вирусологических препаратов.

Дальнейшая работа велась в направлении оптимизации условий амплификации с выбранными праймерами для детекции норо- и энтеровирусов. На первом этапе экспериментального сравнения проводили постановку ПЦР со всеми возможными сочетаниями праймеров и зондов.

Первичную оценку праймеров и зондов осуществляли в следующих условиях: по 10 pmol праймеров, 10 pmol зонда, буфер, содержащий 65 мМ Трис-HCl, 16,6 мМ $(NH4)_2SO_4$, 2 мМ $MgCl_2$, 0,02% Твин 20, по 200 мкм дНТФ, 5 ед. Taq-полимеразы; режим амплификации: 95° — 5’, 45 циклов 95° — 10”, 60° — 30”.

Полученные результаты с праймерами и зондами для амплификации кДНК норовирусов (таблица 2, рисунок 1) показали, что значения пороговых циклов (Ct) были меньше для комбинаций с прямым праймером NoJJV2f.

Результаты экспериментов с праймерами и зондами для амплификации кДНК энтеровирусов (таблица 3, рисунок 2) показали, что значение порогового цикла было меньше для комбинации с прямым праймером EVf1 и зондом EVpr5.

Таблица 1 — Исследуемые праймеры и зонды для амплификации норовирусов и энтеровирусов

| Праймеры и зонды для амплификации норовирусов | Праймеры и зонды для амплификации энтеровирусов |
|---|---|
| No-JJV2F (прямой) | EVf1(прямой) |
| No-G2F(прямой) | EVf3(прямой) |
| No-coG2F(прямой) | EVr(обратный) |
| NoG2-pr (зонд) | EVpr3(зонд) |
| NoG2R(обратный) | EVpr5(зонд) |
| COG2R(обратный) | EVpr10(зонд) |

Таблица 2 — Пороговые циклы реакции (Ct) при использовании различных сочетаний праймеров в ПЦР для амплификации кДНК норовирусов. Во всех случаях использовали один зонд — NoG2-pr

| | NoJJV2f | NoG2F | No-coG2F |
|---|---|---|---|
| NoG2R | 37,3 | 37,9 | 37,6 |
| CoG2R | 36,9 | 38,3 | 38,0 |

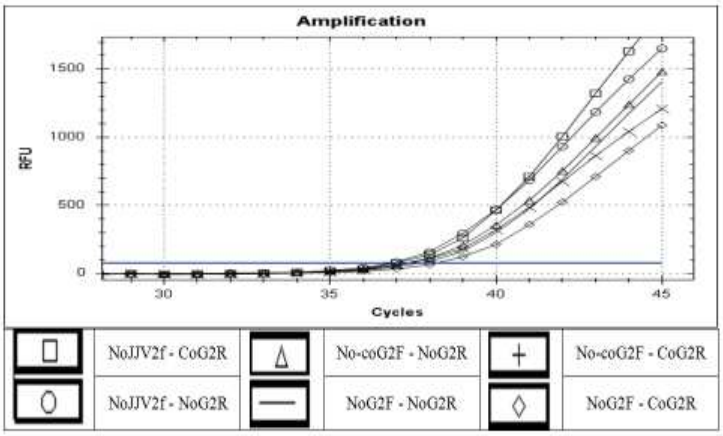



Рисунок 1 — Кривые флюоресценции при амплификации кДНК норовирусов с использованием различных сочетаний праймеров

Таблица 3 — Пороговые циклы реакции при использовании различных сочетаний праймеров и зондов для амплификации кДНК энтеровирусов

| Прямой праймер | Гибридизационный зонд | Обратный праймер | Пороговый цикл реакции |
|---|---|---|---|
| EVf1 | EVpr3 | EVr | 36,3 |
| EVf1 | EVpr5 | EVr | 35,7 |
| EVf1 | EVpr10 | EVr | 36,4 |
| EVf3 | EVpr10 | EVr | 36,1 |

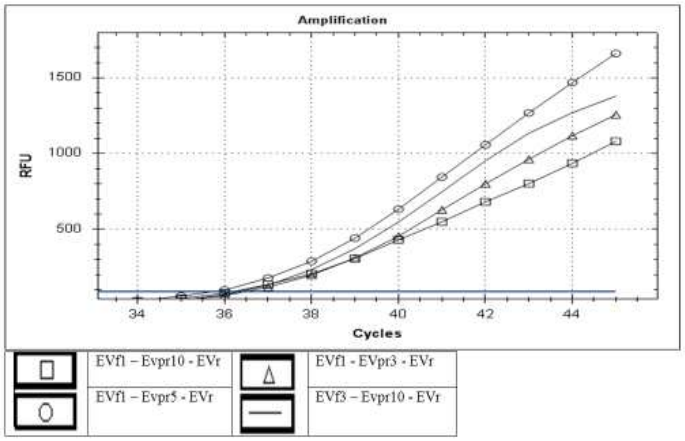



Рисунок 2 — Кривые флюоресценции при амплификации кДНК энтеровирусов с использованием различных сочетаний праймеров и зондов

Далее проводили оптимизацию концентрации ионов магния в ПЦР-смеси. Для этого осуществляли постановку ПЦР со всеми комбинациями праймеров и зондов на норо- и энтеровирусы при концентрации ионов магния от 2 до 7 мМ с шагом в 1 мМ. По результатам экспериментов были отобраны по две комбинации праймеров на норо- и энтеровирусы, показавшие минимальное значение порогового цикла при сходной концентрации ионов магния (5 мМ) (таблица 4).

Следует отметить, что выбор праймеров, показавших лучший результат при сходной концентрации ионов магния, был обусловлен возможностью дальнейшего совмещения двух систем праймеров и зондов в одной пробирке (мультиплексировании).

Следующий этап был посвящен поиску оптимальной температуры отжига праймеров и зондов при ПЦР. Результаты (таблица 5) показали, что самые низкие значения пороговых циклов реакции достигались при использовании температур отжига 58–60°С.

Таблица 4 — Праймеры и зонды для амплификации кДНК норовирусов и энтеровирусов, отобранные для дальнейшей оптимизации ПЦР

| Праймеры и зонды для амплификации кДНК норовирусов | Праймеры и зонды для амплификации кДНК энтеровирусов |
|---|---|
| NoJJV2f – NoG2-pr – NoG2R | EVf1 – Evpr10 – EVr |
| NoJJV2f – NoG2-pr – CoG2R | EVf3 – Evpr10 – EVr |

Таким образом, в результате серии экспериментов были определены оптимальные условия амплификации (состав реакционной смеси, режим амплификации) для выявления кДНК энтеро- и норовирусов методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

**Выводы.** В ходе исследований разработаны праймеры и гибридизационные зонды для индикации норо- и энтеровирусов методом ПЦР в реальном времени с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. В результате оценки основных параметров (вырожденность, Tm, GC%, ΔG, образование димеров, шпилек и наличие сайтов неспецифического связывания) было выбрано 3 прямых прай-

мера, 1 зонд и 2 обратных праймера для норовирусов и 2 прямых праймера, 3 зонда и 1 обратный праймер для индикации энтеровирусов. Подобраны условия идентификации норо- и энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции: состав реакционной смеси и температурный режим амплификации. Экспериментально отобраны по две системы праймеров и зондов для индикации норо- и энтеровирусов, которые работают в одинаковых условиях. Данные праймеры и зонды будут использоваться в качестве основы при создании коммерческого препарата для экспресс-индикации вирусных патогенов в объектах питьевого водоснабжения.

Таблица 4 — Праймеры и зонды для амплификации кДНК норовирусов и энтеровирусов, отобранные для дальнейшей оптимизации ПЦР

| Tm | NoJJV2f – NoG2-pr – NoG2R | NoJJV2f – NoG2-pr – CoG2R | EVf1 – Evpr10 – EVr | EVf3 – Evpr10 – EVr |
|---|---|---|---|---|
| 58 | 27,4 | 27,77 | 27,3 | 27,8 |
| 60,1 | 26,6 | 28,1 | 27,5 | 26,7 |
| 62 | 27,7 | 27,9 | 28.2 | 30,3 |
| 64,2 | 29,6 | 28,6 | 29,8 | 32,5 |
| 66,1 | 30,5 | 28,6 | 32,6 | 34,8 |
| 68 | 32,8 | 31,3 | 35,6 | 37,8 |

**Литература**

1. Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus / T.V. Amvrosieva [et al.] // Cent. Eur. J. Public Health. — 2001. — Vol. 9. — P. 154–157.
2. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents / T.V. Amvrosieva [et al.] // Cent. Eur. J. Public Health. — 2006. — Vol. 14. — P. 67–73.
3. Wilhelmi, I. A. Viruses causing gastroenteriris / I. Wilhelmi, E. Roman, A. Sanchez-Fauquier // Clin. Microbiol. Infect. — 2003. — Vol. 9. — P. 247–262.
4. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000 / B.A. Lopman [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 1. — P. 90–96.
5. Food-borne viruses in Europe. Rapid detection of transnational food-borne viral infections and elucidation of transmission routes through molecular tracing and development of a common database: Final report. — 2004.

## PCR OPTIMIZATION FOR EXPRESS INDICATION OF ENTERIC VIRUSES IN DRINKING WATER

**Dziadziulia K.L., Paklonskaya N.V., Amvrosieva T.V.**

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

The study presents the results of development of primers and hybridization probes for real time PCR indication of noro- and enteroviruses. Two systems of primers and probes, working in the same reaction conditions were experimentally selected. They will be used for development of a commercial kit for express indication of viruses in drinking water.

**Keywords:** enterovirus, norovirus, viral infection, diagnosis, polymerase chain reaction.

Поступила 04.09.2013

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ НЕИММУННОЙ ВОДЯНКИ ПЛОДА, ВЫЗВАННОЙ ПАРВОВИРУСОМ В19

**Ермолович М.А.[1], Леонова Е.Ю.[2], Шишко Г.А.[2], Артюшевская М.В.[2], Бабенко А.С.[1], Самойлович Е.О.[1]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Водянка плода является редкой, но значимой причиной перинатальной заболеваемости и смертности, и определяется при наличии подкожного отека тканей и жидкости в одной или не-

скольких полостях организма. В 90% случаев водянка плода обусловлена неиммунными причинами. Среди возбудителей инфекционных заболеваний, приводящих к водянке плода, наибольшее значение имеет парвовирус B19. В РеспубликеБеларусь в 2012–2013 гг. парвовируснаяинфекция была подтверждена у пяти женщин с признаками водянки плода, выявленными при скрининговом ультразвуковом исследовании. В работе представлены данные лабораторной верификации диагноза, течения и исхода этих беременностей.

**Ключевые слова:** водянка плода, парвовирус B19, антенатальная гибель плода, недоношенность.

**Введение.** Водянка плода является редкой, но значимой причиной перинатальной заболеваемости и смертности, и определяется при наличии подкожного отека тканей и жидкости в одной или нескольких полостях организма (асцит, гидроперикард, гидроторакс и др.). Частота распространенности по данным литературы составляет 1 на 4000 беременностей [1]. В развитии водянки плода выделяют как иммунные, так и неиммунные причины. Благодаря профилактическим мероприятиям, количество случаев иммунной водянки плода, связанной с изоиммунизацией по D-антигену резус-фактора, значительно снизилось. Однако изоиммунизация может происходить и по другим системам антигенов крови, таким как AB0, MNSs, Kell, Duffy, Kidd, Diego, что также может приводить к развитию иммунной водянки плода [2].

В 90% случаев развитие водянки плода происходит вследствие различных неиммунных причин, которые можно разделить на следующие группы нарушений: сердечно-сосудистые (большой дефект межжелудочковой перегородки, критический аортальный стеноз, гипоплазия правых отделов сердца, тахиаритмия плода, кардиомиопатия, миокардит), хромосомные (трисомия 21, 18, 13, синдром Смит-Лемли-Опиц), анемии различной этиологии (альфа-талассемия), синдром фето-фетальной трансфузии, метаболические (мукополисахаридозы, недостаточность галактозы-6-сульфатазы, недостаточность фосфотрансферазы) и инфекционные заболевания [1].

К инфекционным заболеваниям, приводящим к неиммунной водянке плода (НВП), относятся парвовирусная инфекция, токсоплазмоз, аденовирусная инфекция, энтеровирусная (вирус Коксаки) инфекция, краснуха [3]. Среди них наибольшее значение имеет парвовирусная инфекция. Возбудитель, парвовирус B19, является небольшим (22–24 нм) ДНК-содержащим вирусом, относящимся к роду *Erythrovirus* семейства *Parvoviridae*, который обладает тропизмом к эритроидным клеткам-предшественникам человека [4]. По данным Ergaz Z. и соавт., частота острой парвовирусной инфекции во время беременности составляет около 1% в межэпидемический период, а в период подъема заболеваемости может возрастать до 10% [5].

У беременных клиническими проявлениями парвовирусной инфекции могут являться инфекционная эритема, артропатия, лихорадка, симптомы острого респираторного заболевания, однако нередко инфекция протекает бессимптомно [6]. Трансплацентарная передача возбудителя происходит в 24–51% случаев, что может приводить к внутриутробной гибели плода, спонтанным абортам, преждевременным родам, анемии, неиммунной водянке плода, плевральному и миокардиальному выпоту, кардиомиопатии, застойной сердечной недостаточности, гепатоспленомегалии, гидроцефалии, кальцификатам головного мозга, а также увеличению массы плаценты [5, 7]. Проявление симптомов инфицирования парвовирусом B19 у плода может развиваться через 2–6 недель после перенесенного женщиной заболевания, хотя высокая вероятность внутриутробного инфицирования сохраняется не менее 12 недель. Риск развития водянки плода после инфицирования женщины, по наблюдениям Enders et al., составлял от 3,9 до 7,1%, при этом пик заболеваемости наблюдался с 21 по 24 недели гестации [8].

В Республике Беларусь диагностика острой парвовирусной инфекции проводится с 2005 г., однако данные о роли этого заболевания в развитии патологического течения беременности практически отсутствуют. Настоящее исследование было предпринято с целью изучения роли парвовируса B19 в развитии неиммунной водянки плода.

**Пациенты и методы исследования.** С февраля 2012 г. по август 2013 г. для подтверждения парвовирусной инфекции были лабораторно обследованы женщины с признаками водянки плода, выявленными при скрининговом ультразвуковом исследовании, а также их новорожденные или плод. У всех женщин изоиммунизация по антигенам резус-фактора (иммунная водянка) была исключена. Материалом для исследования являлись сыворотка крови, пуповинная кровь, носогло-

точный смыв, моча, околоплодные воды, экссудат серозных полостей. Лабораторными критериями парвовирусной инфекции считали наличие специфических IgM антител, диагностически значимое нарастание уровня IgG антител, выявление вирусной ДНК.

IgM и IgG антитела к парвовирусу B19 в сыворотке крови выявляли в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих наборов производства Serion/Virion, Германия. ДНК выделяли из 200 мкл клинического образца с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Нидерланды). Амплификацию фрагмента генома парвовируса проводили методом ПЦР в реальном времени [9].

**Результаты и их обсуждение.** В течение 2012–2013 гг. у 5 женщин была лабораторно подтверждена парвовирусной инфекции, вызвавшая инфицирование плода. У всех женщин основанием для лабораторного обследования послужило выявление при скрининговом ультразвуковом исследовании признаков водянки плода (таблица). В 4 из 5 случаев определялась водянка плода с наличием отека мягких тканей, асцита, гидроторакса, в 2 из них также гидроперикарда, которые наиболее часто наблюдаются при парвовирусной инфекции. В пятом случае у плода имелись только УЗ-данные изолированного гидроторакса. Такой характер поражения плода наблюдается значительно реже, чем водянка, однако также был описан рядом авторов [10, 11].

При лабораторном обследовании у всех женщин в сыворотке крови была выявлена ДНК парвовируса B19, что, согласно данным литературы, считается основным диагностическим критерием парвовирусной инфекции у пациентов с водянкой плода [12]. Специфические IgM антитела были обнаружены лишь у 2 из 5 женщин. Известно, что IgM антитела формируются при острой парвовирусной инфекции у всех иммунокомпетентных лиц, однако при обследовании женщин с водянкой плода их выявление не всегда возможно. Поскольку от момента инфицирования женщины до заболевания плода проходит от двух до 12 недель, а в ряде случаев и более, и установить истинную продолжительность этого периода нередко не представляется возможным, то на момент проведения обследования IgM антитела могут уже не определяться [13].

У всех женщин были выявлены IgG антитела к парвовирусу B19, свидетельствующие о перенесеннойинфекции, однако их наличие не позволяет установить время заболевания. Только у одной беременной (с изолированным гидротораксом плода) в первом образце сыворотки IgG антитела присутствовали в минимальной концентрации, а во втором образце, забранном через неделю после первого, их уровень повысился более чем в 10 раз. Такое диагностически значимое нарастание концентрации IgG антител явилось дополнительным лабораторным критерием острой парвовирусной инфекции.

При исследовании сыворотки крови новорожденных или пуповинной крови плодов IgM антитела к парвовирусу B19 не были выявлены ни в одном случае. Известно, что специфические IgM антитела не передаются трансплацентарно, и их наличие отражает собственный иммунный ответ ребенка, однако в данном наблюдении его формирование выявить не удалось .

Подтверждение внутриутробного инфицирования парвовирусом B19 было получено в четырех из пяти случаев на основании выявления вирусной ДНК в сыворотке крови новорожденных (два случая), пуповинной крови плода (один случай) или выпоте брюшной полости новорожденного (один случай). У одного ребенка с резко выраженной водянкой плода вирусная ДНК в сыворотке крови обнаружена не была. Согласно данным литературы, наиболее высокая вероятность выявления ДНК парвовируса B19 наблюдалась при исследовании околоплодных вод [14]. Однако в данном случае какой-либо иной биологический материал, кроме сыворотки, исследован не был, и диагноз был установлен на основании результатов обследования женщины. Как правило, ни в одном исследовании не удается выявить все лабораторные критерии парвовирусной инфекции у 100% обследованных женщин и их новорожденных (плода). Поэтому для подтверждения диагноза важно проводить обследование как матери, так и ребенка с использованием как серологических, так и вирусологических методов.

В двух случаях развития водянки плода парвовирусной этиологии беременность закончилась антенатальной гибелью плода в сроке гестации 27 и 33 недели, соответственно.

У трех женщин беременность завершилась рождением недоношенных детей в сроке гестации от 30 до 35 недель. У всех новорожденных определялся отекмягких тканей и наличие жидкости более чем в одной серозной полости, включая и ребенка, имевшего по данным УЗИ лишь изолированный гидроторакс. Всем трем детям потребовалось проведение искусственной вентиляции легких.

Таблица — Эпидемиологические, лабораторные и клинические данные случаев водянки плода, обусловленных парвовирусом В19

| Возраст жен-щины, лет | Данные скринигового УЗИ | Лабораторные критерии парвовирусной инфекции у женщины | Лабораторные критерии парвовирусной инфекции у ребенка/ плода | Срок гестации при рождении, недель / пол | Вес / рост при рождении | Оценка по Апгар при рождении | Течение раннего неонатального периода / исход беременности |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 29 | Асцит, гидроторакс, гидроперикард, отек мягких тканей, киста пуповины | IgM – ПЦР + | IgM – ПЦР+ | 30–31, жен. | 1460 г / 42 см | 5/ИВЛ | Полисерозит (асцит, гидроторакс, гидроперикард), анемия, тромбоцитопения, холестатический гепатит. Выписан домой в удовлетворительном состоянии |
| 26 | Водянка плода, ацит, гидроторакс, гидроперикард | IgM – ПЦР + | IgM – ПЦР+ | 34, муж. | 3100 г / 46 см | 4/ИВЛ | Легочно-сердечная недостаточность, анасарка (асцит, гидроторакс, гидроперикард), преренальная ОПН, инфекционо-токсический шок. Умер на 2-е сут жизни |
| 24 | Водянка плода, гидроторакс, асцит, отек мягких тканей | IgM + ПЦР + | IgM – ПЦР+ | 27, муж. | 1470 г / 37 см | | Антенатальная гибель плода |
| 23 | Водянка плода, гидроторакс, асцит, отек мягких тканей | IgM – ПЦР + | IgM – ПЦР– | 33, муж. | 3580 г/ 50 см | | Антенатальная гибель плода |
| 20 | Двусторонний гидроторакс | IgM + ПЦР + | IgM – ПЦР+ | 34–35, муж. | 2920 г/ 48 см | 6/ИВЛ | Врожденная пневмония, гидроторакс, асцит, отечный синдром, синдром эндогенной интоксикации. Выписан домой в удовлетворительном состоянии |

Несмотря на проводимую интенсивную терапию у одного ребенка развился инфекционно-токсический шок, острая почечная недостаточность и на 2-е сут жизни наступил летальный исход. У двух детей лечение привело к быстрому купированию симптомов водянки и нормализации основных клинико-лабораторных показателей. Оба ребенка были выписаны домой в удовлетворительном состоянии.

Все женщины с лабораторно подтвержденной водянкой плода парвовирусной этиологии были в возрасте от 20 до 29 лет и проживали в Минской, Гомельской и Витебской областях. Только одна женщина указала на наличие заболевания с кратковременной макуло-папулезной сыпью приблизительно за 3 мес. до установления диагноза водянка плода. В остальных 4 случаях заболевание с сыпью или контакт с больными с сыпьюв период беременности женщины отрицают. Две из них указывают на перенесенное в легкой форме острое респираторное заболевание, одна — на беспокоившую ее в течение нескольких дней выраженную артралгию за 8–12 недель до выявления водянки плода.

Эти данные согласуются с результатами выявления парвовирусной инфекции у лиц с экзантемными заболеваниями в Беларуси [15]. Около 30% заболевших составляли взрослые 19 лети старше, и основная их часть приходилась на лиц 19–29 лет. Поскольку экзантемная форма заболевания преимущественно встречается у детей, а для взрослых более характерно развитие артропатии, то можно предполагать, что истинное распространение парвовирусной инфекции среди взрослых является еще более высоким. Это создает высокий риск инфицирования женщин в период беременности и развития патологии плода, что подтвердило и данное исследование.

**Выводы.** Парвовирусная инфекция является одной из важных причин развития неиммунной водянки плода. В 2012–2013 (8 мес.) гг. в Беларуси было лабораторно подтверждено пять случаев неиммунной водянки плода, обусловленных парвовирусом B19. У всех женщин подтверждение диагноза было получено на основании выявления вирусной ДНК в сыворотке крови, у двух из них также определялись IgM антитела к парвовирусу B19. В биологических жидкостях четырех из пяти новорожденных и плодов также была выявлена вирусная ДНК. Из 5 беременностей две закончились антенатальной гибелью плода в сроке гестации 27 и 33 недели, еще три — рождением детей в сроке гестации 30–34 недели, один из которых умер на 2-е сут жизни.

Все женщины с установленным диагнозом водянки плода парвовирусной этиологии были в возрасте 20–29 лет. Ранее проведенные в стране исследования свидетельствовали о наиболее высоком распространении парвовирусной инфекции именно в этой возрастной группе взрослых лиц. Учитывая высокий риск инфицирования женщин в период беременности, необходимо проявлять настороженность и проводить лабораторное обследование во всех случаях подозренияна возможное инфицирование парвовирусом B19. Для верификации диагноза наиболее эффективным является комбинированное использование серологических и молекулярных методов, а также проведение обследования как женщины, так и новорожденного (плода).

**Литература**

1. Speer, M.E. Immune and non-immune hydrops fetalis / M.E. Speer // Neonatol. Today. — 2006. — Vol. 1. — P. 1–6.

2. The severity of immune hydrops fetalis is predictive of fetal outcome after intrauterine treatment / van Kamp [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2001. — Vol. 185. — P. 668–673.

3. Forouzan, I. Hydrops fetalis: recent advances / I. Forouzan // Obstet. Gynecol. Surv. — 1997. — Vol. 52. — P. 130–138.

4. Prospective evaluation of 618 pregnant women exposed to parvovirus B19: risks and symptoms / J.H. Harger, [et al.] // Obstet. Gynecol. — 1998. — Vol. 91. — P. 413–420.

5. Parvovirus B19 in pregnancy / Z. Ergaz [et al.] // Reprod Toxicol. — 2006. — Vol. 4. — P. 421–435.

6. Heegaard, E.D. Human parvovirus B19 / E.D. Heegaard // Clin. Microbiol. Rev. — 2002. — Vol. 15. — P. 450–485.

7. Congenital infections, part 2: parvovirus, listeria, tuberculosis, syphilis, and varicella / F.S. Komal [et al.] // Neoreviews. — 2010. — Vol. 11. — P. 681–684.

8. Human parvovirus B19 infection during pregnancy – value of modern molecular and serological diagnostics / M. Enders [et al.] // J. Clin. Virol. 2006. — Vol. 35. — P. 400–406.

9. Ермолович, М.А. Разработка отечественной тест-системы для выявления ДНК парвовируса B19 в клинических образцах / М.А. Ермолович, А.С. Бабенко, Е.О. Самойлович // Сб. респ. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы медицины», Гомель, 16–17 февр. 2012 г. — Гомель, 2012. — С. 8–10.

10. Hydrothorax as a sole manifestation of congenital parvovirus B19 infection / K. Sarafidis [et al.] // Am. J. Perinatol. — 2008. — Vol. 25. — P. 551–554.

11. Parvovirus B19 in pregnancy: possible consequences of vertical transmission / C. Puccetti [et al.] //Prenat. Diagn. — 2012. — Vol. 32. — P. 897–902.

12. Improved diagnosis of gestational parvovirus B19 infection at the time of nonimmune fetal hydrops / M. Enders [et al.] // J. Inf. Dis. — 2008. — Vol. 197. — P. 58–62.
13. Young, N.S. Parvovirus B19 / N.S. Young, K.E. Brown // N. Eng. J.Med. — 2004. — Vol. 350. — P. 586–597.
14. Gestational and fetal outcomes in B19 maternal infection: a problem of diagnosis / F. Bonvicini [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2011. — Vol. 49. — P. 3514–3518.
15.-Human parvovirus B19 surveilance in patients with rash and fever from Belarus / M. A. Yermalovich [et al.] // J. Med. Virol. — 2012. — Vol. 84. — P. 973–978.

## LABORATORY DIAGNOSIS AND PERINATAL ASPECTS OF NON-IMMUNE HYDROPS FETALIS CAUSED BY PARVOVIRUS B19

**Yermalovich M.A.[1], Leonova E.U.[2], Shishko G.A.[2], Artyushevskaya M.V.[2], Babenko A.S.[1], Samoilovich E.O.[1]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*
*[2]Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus*

Fetal hydrops is an important reason of perinatal morbidity and mortality, and is defined as the presence of subcutaneous tissue edema and the collection of fluid in one or more body cavities. About 90% of fetal hydrops is of non-immune origin, and parvovirus B19 is its most important infectious agent. In Belarus in 2013–2013 parvovirus infection was confirmed in five women with hydrops fetalis identified by screening ultrasound investigation. In this paper the laboratory criteria of diagnosis and outcomes of these pregnancies are presented.

**Keywords:** hydrops fetalis, parvovirus B19, stillbirth, prematurity.

Поступила 06.09.2013

## ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

**Землянский В.А., Капитулец С.П.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье рассмотрен новый для отечественной лабораторной практики, малоизвестный широкому кругу исследователей, однако, чрезвычайно перспективный современный молекулярно-биологический метод экспресс-диагностики вирусных и бактериальных инфекций, основанный на реакции петлевой изотермической амплификации (LAMP), технология его проведения, диагностические возможности и достоинства при идентификации в клинических образцах генетического материала широкого круга инфекционных агентов.

**Ключевые слова:** петлевая изотермическая амплификация, молекулярно-биологическая диагностика, вирусные и бактериальные инфекции.

**Введение.** В настоящее время полимеразная цепная реакция (ПЦР) широко распространена и успешно применяется при проведении научных исследований, в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве. Метод зарекомендовал себя как высокоточный, технологичный и удобный для клинико-лабораторного использования. Широкий спектр коммерческих диагностических тест-систем на основе ПЦР доступен для практического применения.

Принцип ПЦР, разработанный Кэрри Муллисом в 1983 г., состоит в многократном копировании искомого участка ДНК возбудителя. При достаточной специфичности выбранного участка генома, метод позволяет сделать вывод о принадлежности исследуемого генетического материала искомому патогену [1].

Общепринятый вариант постановки ПЦР предполагает 25–35 циклов последовательного изменения температуры реакции, обеспечиваемых программируемым устройством [1].

С момента внедрения технология ПЦР претерпела ряд важных усовершенствований и модификаций. В частности, разработка праймеров в последние годы значительно упростилась в связи

с развитием компьютерных баз генетических последовательностей, что ускорило проверку специфичности выбранных для анализа участков генома. Популярность ПЦР значительно возросла с появлением методик визуализации продуктов реакции в режиме реальном времени, основанных на взаимодействии ДНК с флуоресцентными метками. Данные методики позволили преодолеть ряд недостатков, присущих традиционному методу с использованием гель-электрофореза. При этом повысилась чувствительность метода, облегчился и ускорился этап анализа результатов, уменьшился риск контаминации. Также появилась возможность получать количественные данные по кинетике реакции, что требуется для определения исходного титра генетического материала в исследуемой пробе и оптимизации условий проведения реакции [2]. Однако дальнейшему распространению данной технологии в настоящее время препятствует высокая стоимость прецизионных термоциклирующих устройств и оптических детекторов, необходимых для проведения реакции [3].

Современные перспективы развития технологии ПЦР связаны с разработкой методик изотермической амплификации, не требующих дорогостоящего технического обеспечения. Их внедрение открывает широкие возможности для использования ПЦР-анализа в клинической диагностике. Сфера возможного применения данных методов охватывает как относительно крупные медицинские и научно-исследовательские центры, так и небольшие клинико-диагностические лаборатории, вплоть до возможности индивидуального использования.

Реакция петлевой изотермической амплификации (англ. Loop-mediated isothermal amplification — LAMP), в настоящее время считается одним из наиболее перспективных методов такого рода. Впервые представлена в 2000 г. [4]. В реакции используются до шести праймеров, разработанных для взаимодействия с восьмью специфическими участками ДНК. Реакция протекает при постоянной температуре (60–65°C). При этом используется полимераза с геликазной активностью. Сравнительно низкая температура реакционной смеси приводит к накоплению и сохранению больших количеств пирофосфата магния, коррелирующих с концентрацией образовавшейся в реакции ДНК. Это приводит к увеличению оптической плотности, что, в свою очередь, позволяет анализировать протекание реакции в режиме реального времени и фиксировать конечный результат визуально [3].

**Целью** настоящей работы является ознакомить широкий круг медицинских и лабораторных работников с современными достижениями молекулярной биологии в области экспресс-диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

Праймеры для реакции LAMP. Для успешного протекания реакции крайне важны высокоспецифичные праймеры. Разработка праймеров может быть осуществлена с помощью программного обеспечения Primer Explorer. В реакции участвуют три пары праймеров: два внешних, два внутренних и два петлевых. Они взаимодействуют с восьмью специфическими участками исследуемой последовательности ДНК. Прямой (F3) и обратный (B3) внешние праймеры необходимы для инициации реакции и участвуют только в первом этапе. Прямой (FIP) и обратный (BIP) внутренние праймеры имеют сложную структуру и состоят, каждый, из двух специфических участков, соединённых несмысловым линкером (обычно политимин). Внутренние праймеры участвуют в образовании петлевых структур. Прямой (FLP) и обратный (BLP) петлевые праймеры связываются с дополнительными сайтами и не являются обязательными для протекания реакции, однако, их использование значительно ускоряет получение результата [3].

Строение праймеров и взаимное расположение соответствующих участков целевой последовательности представлено на рисунке 1.

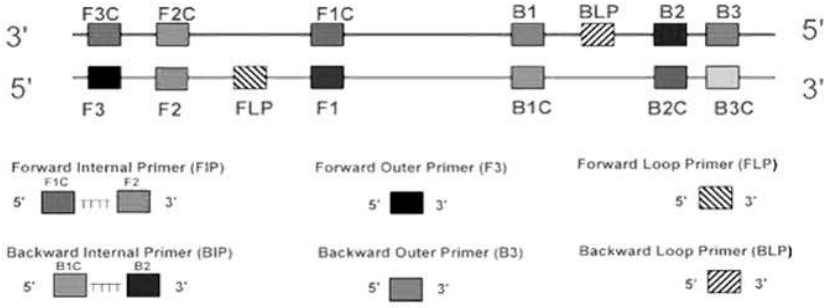



Рисунок 1 — Схема сайтов и праймеров, участвующих в реакции LAMP

Прямой внешний праймер (англ. Forward outer primer — F3) комплементарен участку F3C. Обратный внешний праймер (англ. Backward outer primer — B3) комплементарен участку B3c. Прямой внутренний праймер (англ. Forward internal primer — FIP) имеет на 5’-конце участок F1c, комплементарный участку F1, и участок F2 на 3’-конце, комплементарный участку F2c. Обратный внутренний праймер (англ. Backward internal primer – BIP) состоит из 5’-концевого участка B1c, комплементарного участку B1, и 3’-концевого участка B2, комплементарного участку B2c. Прямой петлевой праймер (англ. Forward loop primer — FLP) комплементарен участку, лежащему между F2 и F1. Обратный петлевой праймер (англ. Backward loop primer — BLP) комплементарен участку между B1 и B2 [3].

Исследования показали, что для успешного протекания реакции размер области, ограниченной участками F2 и B2, должен находиться в пределах 120–180 п.н. Участки F2 и F3, как и B2 и B3, должны находиться на расстоянии не более 20 п.н. Размер участков, образующих петлю (F2-F1 и B2-B1) должен составлять 40–60 п.н. Температура отжига праймеров должна быть близка к температуре проведения реакции [3, 4].

**Механизм реакции.** В основе LAMP лежит самоподдерживающаяся циклическая реакция, осуществляемая ДНК-полимеразой с геликазной активностью. Реакция протекает в два этапа: нециклический и циклический. Нециклический этап заключается в образовании «гантелеобразной» структуры, необходимой для начала циклического процесса. Так как при температуре около 65°C одно- и двуцепочечная формы ДНК находятся в динамическом равновесии, для инициации реакции не требуется нагрев до полной денатурации [5]. После отжига одного из праймеров реакция поддерживается за счет геликазной активности полимеразы.

Схема первого этапа представлена на рисунке 2.

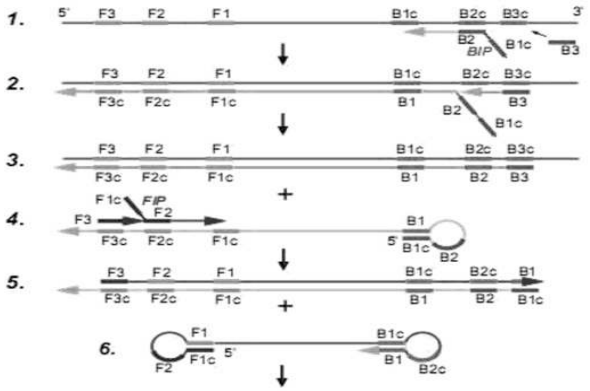



Рисунок 2 — Нециклический этап реакции LAMP

Реакция начинается с отжига одного из внутренних праймеров на участке B2c или F2c (рисунок 2.1). На этой стадии внутренние праймеры связываются с матрицей лишь частично, соответствующим участком (B2 и F2). Затем происходит отжиг соответствующего внешнего праймера и вытеснение цепи, построенной на основе внутреннего праймера (рисунок 2.2). Внутренний праймер при этом замыкает на конце вытесненной цепи петлю, связываясь с участком B1 (F1). Процесс повторяется с противоположного конца цепи (рисунок 2.4). Конечным результатом данного этапа является «гантелеобразная» структура с двумя петлями на концах.

Циклический этап заключается в образовании большого количества сложных продуктов (рисунок 3).

Внешние праймеры на данном этапе не участвуют. Образованная на первом этапе структура использует сама себя в качестве матрицы и достраивается до двойной цепи с петлёй на одном конце (рисунок 3.7). Соответствующий внутренний праймер связывается с петлевым участком, синтез цепи приводит к расплетанию двуцепочечного участка. Второй внешний праймер связывается с освободившимся одноцепочечным участком. В ходе синтеза цепи образуется двуцепочечная структура, содержащая инвертированный повтор и петлю на одном конце (рисунок 3.10). Вытесненная цепь образует «гантелеобразную» структуру, отличную от исходной (рисунок 3.8), которая также инициирует образование инвертированных повторов (рисунок 3.9). Исходная двухпетлевая структура восстанавливается и снова поступает в цикл амплификации (рисунок 3.6) [3, 4].

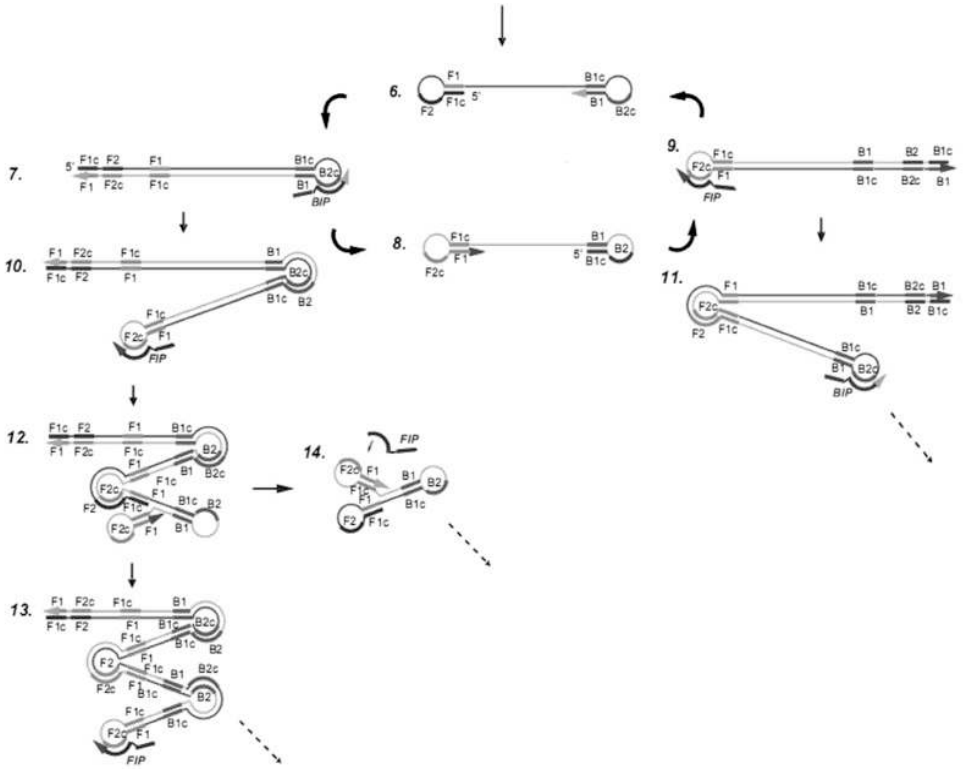



Рисунок 3 — Циклический этап реакции LAMP

Следует подчеркнуть, что петлевые праймеры не являются обязательными компонентами реакции, однако их использование позволяет сократить время проведения анализа. Взаимодействуя с петлевыми структурами в участках, отличных от сайтов связывания внутренних праймеров, они повышают количество побочных продуктов и ускоряют достижение детектируемого уровня ДНК в реакционной смеси в 1,5–2 раза [6].

При использовании Bst-полимеразы оптимальная температура протекания реакции составляет 63ºС. При таких условиях, образование 109 копий целевой последовательности занимает около часа. Добавление петлевых праймеров позволяет сократить время реакции до 30–40 мин. Конечными продуктами реакции являются амплифицированная целевая последовательность в виде инвертированных повторов в составе протяжённых продуктов, а также разнообразные побочные продукты с разветвленной вторичной структурой [3, 6].

***Визуализация результатов реакции.*** Детекция продуктов реакции может быть осуществлена различными способами. При использовании электрофореза в агарозном геле можно наблюдать множество продуктов различной длины (рисунок 4.1). Это позволяет зафиксировать положительный результат реакции, но не дает информации о размерах амплифицированного фрагмента. Также это препятствует проведению мультиплексной реакции. Эти ограничения можно преодолеть путем модификации внутренних праймеров. Модификация заключается во встраивании в линкер между двумя участками праймера сайта рестрикции. После обработки соответствующей эндонуклеазой в пробе в больших количествах накапливается продукт, соответствующий длине амплифицируемого участка (рисунок 4.2) [7]. Также для визуализации результатов LAMP доступна методика, аналогичная ПЦР в реальном времени, использованием меченых ДНК-зондов или флуоресцентных интеркалярных красителей: этидиумбромида, кальцеина, SYBR Green и др. [8, 9].

Кроме того, важной особенностью LAMP является возможность измерения концентрации продукта, основанная на измерении повышения оптической плотности реакционной смеси в видимом спектре. Данный эффект обеспечивается образованием белой взвеси пирофосфата магния. При проведении ПЦР пирофосфат образуется в гораздо меньших количествах и разлагается при нагреве до температур плавления ДНК. Образование видимого осадка также позволяет визуализировать качественный результат реакции визуально (рисунок 5) [8, 9].

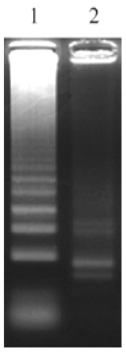



Рисунок 4 — Визуализация результатов реакции LAMP методом гель-электрофореза

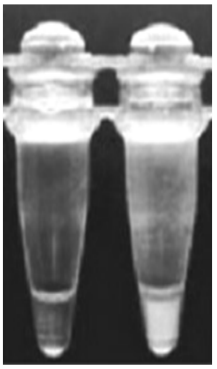


Рисунок 5 — Визуализация осадка пирофосфата магния

**Выводы.** Таким образом, реакция петлевой амплификации имеет ряд преимуществ перед другими видами генетических методов анализов. Наличие как минимум шести участков связывания праймеров обеспечивает крайне высокий уровень специфичности. При этом анализ занимает от одного до полутора часов, включая пробоподготовку и визуализацию результатов. Все компоненты реакционной смеси широкодоступны. Так как реакция протекает при постоянной температуре, необходимые условия могут быть обеспечены посредством водяной бани или простого термостатирующего устройства. Образование видимого осадка пирофосфата магния позволяет определять результаты анализа невооружённым взглядом. Данные обстоятельства открывают широкие перспективы для использования метода петлевой амплификации в клинико-лабораторной практике.

В рамках выполнения государственной программы «Инфекции и микробиологические нанотехнологии» на 2014–2015 гг. в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии планируется проведение исследований, направленных на адаптацию и внедрение технологии петлевой изотермической амплификации в клинико-лабораторную практику учреждений Министерства здравоохранения Республики Беларусь для диагностики и мониторинга актуальных для страны вирусных и бактериальных инфекций.

**Литература**

1.Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R. K. Saiki [et al.] // Science. — 1988. — Vol. 239. — P. 487–491.

2. Real-time PCR in the microbiology laboratory / I. M. Mackay // Clin. Microbiol. Infect. — 2004. — Vol. 10. — P. 190–212.

3. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases / M. Parida [et al.] // Rev. Med. Virol. — 2008. — Vol. 18, № 6. — P. 407–421.

4. Loop mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi [et al.] // Nucl. Acid Res. — 2000. — Vol. 28, № 12. — P. 63.

5. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template / K. Nagamine [et al.] // Clin. Chem. — 2001. — Vol. 47, № 9. — P. 1742–1743.

6. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers / K. Nagamine [et al.] // Mol. Cell. Probes. — 2002. — Vol. 16. — P. 223–229.

7. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites / H. Iseki [et al.] // J. Microbiol. Meth. — 2007. — Vol. 71. — P. 281–287.

8. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation / Ya. Mori [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2001. — Vol. 289. — P. 150–154.

9. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA / Ya. Mori [et al.] // J. Biochem. Biophys. Meth. — 2004. — Vol. 59. — P. 154–157.

## LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION AS INNOVATIVE RAPID TOLL FOR BACTERIAL AND VIRAL DISEASES DIAGNOSTIC

**Zemliansky V.A., Kapitulets S.P.**

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

Loop mediated isothermal amplification (LAMP) is a powerful innovative gene amplification technique. This method provides a simple rapid tool for science and clinical diagnostic. The whole

procedure can be completed in less than 1 hour under isothermal conditions using a set of six specially designed primers that recognize eight distinct regions on the target sequence. Amplification products can be detected by agarose gel electrophoresis as well as by real-time monitoring of turbidity. Alternatively, gene amplification can be visualized by the naked eye. LAMP does not require a thermal cycler and can be performed simply with a heating block or water bath. LAMP has potential applications for clinical diagnosis and surveillance of infectious diseases without requiring sophisticated equipment or skilled personnel.

**Keywords:** Loop-mediated isothermal amplification, viral and bacterial infections.

Поступила 02.09.2013

## ПРИЖИЗНЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТЕАЗОУСТОЙЧИВОГО КОМПОНЕНТА ПРИОННОГО БЕЛКА ВО ФРАКЦИЯХ МЕМБРАН КОМПОНЕНТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА

**Капитулец С.П.[1], Жавнерко Г.К.[2], Ничипорук О.И.[1], Парибок И.В.[2], Капитулец Н.Н.[1], Махров М.В.[3], Докукина Т.В.[3]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Институт химии новых материалов НАН Беларуси;*

*[3]РНПЦ психического здоровья, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Описан новый способ детектирования протеазоустойчивого компонента прионного белка PrP27–30 — коррелята инфекционности при прионных болезнях. Способ заключается в иммобилизации анализируемого образца на заданных участках модифицированной поверхности гидрофильного кремния, ферментативном переваривании всех протеазочувствительных белков, представленных на кремниевой подложке и иммунологическом взаимодействии PrP27–30 с антиприонными моноклональными антителами. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Способ апробирован для прижизненной диагностики прионных болезней у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и церебральными амилоидозами неясного генеза.

**Ключевые слова:** нейродегенеративные болезни, прионный белок, лабораторная диагностика, атомно-силовая микроскопия

**Введение.** Все известные до настоящего времени лабораторные методы диагностики прионных болезней человека и животных, за единичными исключениями, рассчитаны на постмортальное исследование мозга [1]. Обязательными по требованию ВОЗ подтверждающими тестами для данной патологии остаются иммуногистохимическое выявление в срезах тканей мозга аномальной формы приона с молекулярной массой 33–35 кДа (PrPd, англ. disease — болезнь), иммунный блоттинг и иммуноферментный «сэндвич» анализ гомогенатов ткани мозга с идентификацией протеазоустойчивого компонента с М.м. 27–30 кДа (PrP27–30) [2]. Важной информацией обеспечивает электронная микроскопия, позволяющая обнаруживать прион-специфические фибриллярные структуры, типа палочек и скрепи-ассоциированных фибрилл [3]. Во всех методиках принципиальным является выявление патологической изоформы PrPd как единственного молекулярного маркера болезни.

Современные подходы к разработке прижизненной диагностики прионных болезней базируются на использовании сверхчувствительных методов детекции молекул белка в клиническом образце с уровнями чувствительности метода, соответствующими нескольким атоммолям. Показано, что технические решения и приборная реализация метода атомно-силовой микроскопии позволяют использовать его как универсальный детектор при определении и идентификации различных патогенных возбудителей: бактерий, риккетсий и вирусов [4]. В этом случае чувствительность анализа увеличивается на 2–3 порядка.

До настоящего времени ни в Беларуси, ни в Российской Федерации, ни в странах СНГ подобных диагностических подходов и разработок в доступной для анализа литературе не выявлено.

**Цель:** разработка способа и повышение точности прижизненного обнаружения аномальной протеазоустойчивой формы прионного белка у пациентов с нейродегенеративными поражениями мозга неустановленной этиологии.

Материалы и методы. В работе использовали образцы венозной крови пациентов, находящихся на лечении в стационаре РНПЦ психического здоровья, с клиническими диагнозами: болезнь Крейтцфельдта-Якоба? (БКЯ) — 2, болезнь Альцгеймера – 9, сосудистая деменция — 5, органический амнестический синдром — 4, органическое шизофреноподобное расстройство — 2, шизофрения параноидная — 2, смешанное тревожное и депрессивное расстройство — 1, конверсионное расстройство моторики — 2. Всего исследовано 29 образцов.

Лейкоциты из периферической крови получали в соответствии с практическими указаниями Д. Клауса [5]. Фракцию мембран клеток тотальной крови получали 3-кратным центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Осадки разводили фосфатно-солевым буферным раствором, pH 7,2–7,4, содержащим 0,05% Твин-20. В ряде экспериментов лизаты компонентов крови подвергали ферментативному перевариванию (ФСБ, pH 7,4, с 1 мМ $CaCl_2$ и протеиназой К в конечной концентрации 20 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°С. Протеиназу К инактивировали добавлением раствора 1 мМ фенилметилсульфонил флюорида (PMSF, Sigma).

Для селективной иммобилизации белков из анализируемого образца получали нанокомпозитные сенсорные покрытия на пластинах монокристаллического кремния (кремневые подложки), предварительно очищенных путем гидрофилизации в смеси $H_2O$:$H_2O_2$:$NH_4OH$ (5:1:1) в течение 15 мин при температуре 65–70ºС, отмывания бидистиллированной водой и высушивания в токе азота.

Визуализацию протеазоустойчивого компонента прионного белка PrP27–30 и специфических иммунных комплексов PrP27–30+анти-PrP моноклональное тело (МАТ) на кремневых подложках осуществляли методом АСМ путем сканирования их поверхности с помощью микроскопа Nanoscope IIIa (Veeco, США), оборудованного «D-сканером» в контактном режиме (contact mode), как описано ранее [6].

В качестве положительного контроля для анализа методом АСМ использовали головной мозг сирийского золотистого хомяка, экспериментально инфицированного возбудителем скрепи, шт. 263 К, а также аутопсийные образцы мозга (кора больших полушарий) 3-х умерших пациентов в 2009–2011 гг. с клиническими и лабораторно подтвержденными диагнозами БКЯ (2) и амиотрофический лейкоспонгиоз — АЛ (1) [6]. Наличие протеазоустойчивого компонента прионного белка PrP 27–30 в аутопсийном материале было подтверждено методом иммунного блоттинга [7].

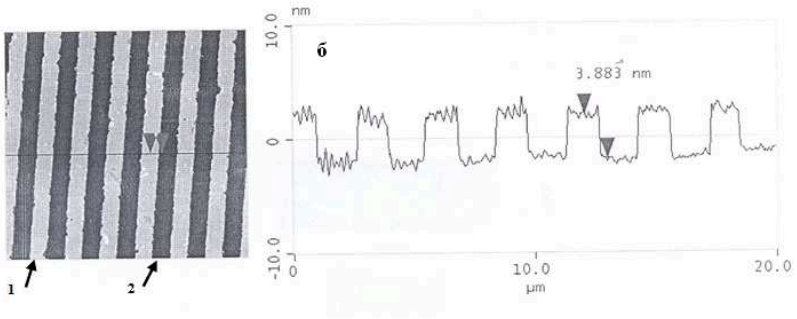
**Результаты и их обсуждение.** Ранее нами был предложен способ обнаружения аномальной протеазоустойчивой формы прионного белка в аутопсийных образцах мозга при прионных болезнях человека и животных [8]. Использование метода АСМ на локально активированной поверхности кремния в нашей модификации позволило достоверно выявлять присутствие прионного белка в ткани мозга у экспериментальных животных, инфицированных скрепи, и умерших с клиническими диагнозами БКЯ и АЛ [9].

В соответствии с предложенной методологией была отработана технология формирования микроструктурированных пленок на поверхности кремния, которая включает несколько этапов:

1) этап гидрофилизации поверхности кремния путем нагревания в смеси H2O:H2O2:NH4OH с последующей тщательной промывкой и сушкой в токе азота (см. раздел «Материалы и методы»);

2) этап модификации кремневой калибровочной решетки TGZ3 для АСМ (высота «ступенек» 540±2 нм, шаг 3 мкм) с использованием 1% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА). БСА адсорбируют на поверхность микроштампа, помещая на его поверхность каплю раствора, в течение 15 мин при комнатной температуре с последующим отмыванием и высушиванием в токе азота;

3) этап микроконтактной печати — отпечатывание полос БСА на твердую поверхность гидрофильного кремния наложением на кремний модифицированного БСА штампа в течение 40–60 с. Полученный образец высушивают при комнатной температуре и сохраняют до использования. Сформированная микроструктурированная пленка, представленная регулярно чередующимися полосами БСА на поверхности кремния, служит в качестве блокатора неспецифической адсорбции иных белков на этих участках подложки и представляет собой реперные полосы-сравнения необходимые для проведения последующего АСМ-анализа. Контроль иммобилизации БСА на поверхность гидрофильного кремния осуществляют методом АСМ (рисунок 1).




1 — полосы бычьего сывороточного альбумина; 2 — активированная поверхность кремния:
а — АСМ в контактном режиме, б — графический микропрофиль
Рисунок 1 — Образец с микроконтактной печатью

Как показано на рисунке 1, при АСМ-анализе активированной кремневой подложки полосы БСА, служащих поверхностью сравнения, четко отличаются от немодифицированных участков. Перепад высот у БСА при микроконтактной печати составлял в зависимости от серии приготовленных образцов от 1,6 до 3,9 нм (в среднем 3,1 нм). Полосы БСА блокировали неспецифическую адсорбцию на модифицированной поверхности кремния. Их наличие обеспечивает дальнейшую эффективную иммобилизацию белков из анализируемого образца в промежутки между полосами БСА.

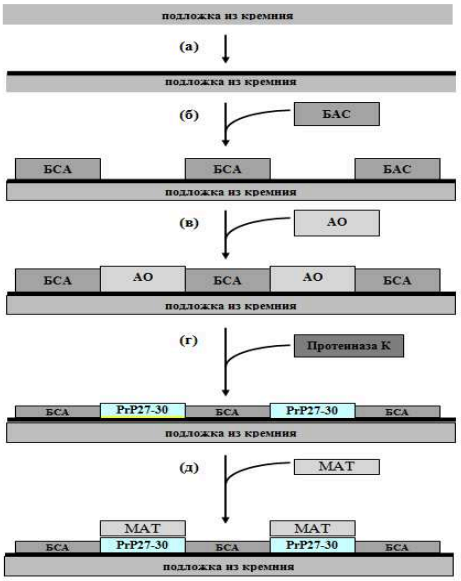
С целью повышения точности способа и возможности его использования для прижизненного обнаружения протеазоустойчивого компонента PrP27–30 патологического прионного белка у пациентов с дегенеративным поражением мозга неустановленной этиологии, в т. ч.е при церебральных амилоидозах, нами предложен и апробирован принципиально новый вариант способа, заключающийся в первоначальной иммобилизации анализируемого образца, предположительно содержащего патологический прионный белок, на участки поверхности гидрофильного кремния, активированного микроконтактной печатью БСА, с последующей обработкой специфическими антиприонными моноклональными антителами и детектированием образованного комплекса «антиген-антитело» методом АСМ, что позволяет доказать наличие патологического прионного белка в анализируемом образце [10].

Алгоритм обнаружения компонента PrP27–30 патогенного прионного белка в анализируемом образце показан на рисунке 2.

Согласно предложенной методологии иммобилизацию PrPd из образца осуществляют в промежутки между полосами БСА с последующим ферментативным перевариванием всех протеазочувствительных белков, представленных на кремниевой подложке. Протеолитическая обработка PrPd удаляет только N-концевую область белка с образованием протеазоустойчивого компонента 27–30 кДа.

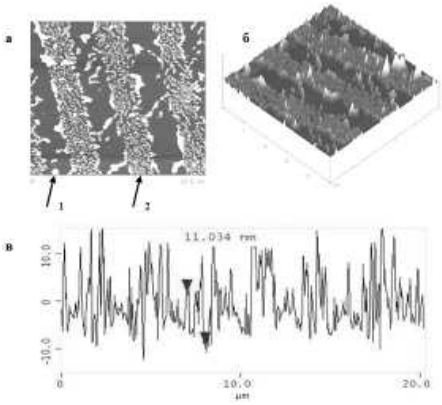
При анализе АСМ-изображений полученных после иммобилизации на поверхности гидрофильного кремния как положительных образцов, содержащих PrPd (суспензии мозга лабораторных животных и умерших людей), так и клинического материала от пациентов с различными нейродегенеративными заболеваниями неустановленного генеза (суспензии лизированных лейкоцитов периферической крови, пулы мембран компонентов крови) и последующей ферментативной обработки анализируемых образцов протеиназой К оказалось, что уровень полос иммобилизованных белков только у некоторых заведомо положительных образцов был незначительно выше уровня полос БСА, деградированных протеолизом (≤2 нм) (рисунок 3). После ферментативной обработки поверхности кремния у подавляющего большинства анализируемых образцов оставались практически ровными, без четко наблюдаемого перепада высот.

Установлено, что высоты иммунных комплексов PrP27-30+анти-PrP МАТ в положительных образцах варьировали в широких пределах от 8,6 до 38,7 нм., по-видимому, вследствие особенностей анализируемых образцов, из которых ведущими являются биохимические свойства прионных белков, их концентрация в образце и пространственная локализация на подложке. Иммобилизации PrP 27–30 и анти-PrP МАТ на полосы БСА не отмечено. Количество иммунокомплексов увеличивалось обратно пропорционально кратности разведения биопробы. Использование в опытах нескольких анти-PrP МАТ позволяло существенно увеличить чувствительность и специфичность АСМ (данные не показаны).




БСА — бычий сывороточный альбумин; АО — анализируемый образец, содержащий протеазоустойчивый компонент PrP27–30, МАТ — анти-PrP моноклональное антитело:
(а) — гидрофилизация поверхности кремния, (б) — микроконтактная печать БСА,
(в) — иммобилизация анализируемой пробы, содержащей PrPd, (г) — ферментативное обработка протеиназой К, (д) — иммунологическое взаимодействие типа «антиген-антитело»

Рисунок 2 — Алгоритм прижизненного выявления протеазоустойчивого компонента PrP27–30 при церебральных амилоидозах




1 — БАС, деградированный протеолизом; 2 — иммунный комплекс PrP27-30+анти-PrP МАТ:
а — АСМ в контактном режиме, б — трехмерное изображение, в — графический микропрофиль
Рисунок3 — АСМ-изображение пространственных форм положительного прионного образца на локально-активированной подложке кремния после иммобилизации PrPd, ферментативной обработки и этапа обработки анти-PrP моноклональными антителами

Очевидно также, что анти-PrP МАТ достаточно эффективно взаимодействовали с протеазоустойчивым компонентом PrP27–30, иммобилизованным на подложках как из исходного лизата, так и из суспензии, предварительно обработанных ферментазой (протеиназой К). В последнем случае результаты АСМ-анализа были менее четкими, по-видимому, вследствие наличия в протеолитических переварах большого количества низкомолекулярных пептидов, активно конкурирующих за участки связывания на поверхности гидрофильного кремния с относительно более организованными молекулами PrP27–30. При этом иммунные комплексы удавалось наблюдать при разведениях образ-

цов в 10-2, 10-4 и 10-6, что значительно превышает чувствительность всех известных лабораторных методов.

Факт выявления иммунных комплексов PrP27–30+анти-PrP МАТ свидетельствует о том, что подобное взаимодействие может эффективно осуществляться только когда PrP27–30 находится в состоянии близкой к мономерному (и/или олигомерному), а третичная структура обеспечивает расположение активных антиген-связывающих сайтов на поверхности иммобилизованной глобулы (и/или олигомера), разрешающее специфическое связывание с антителами.

Наивысший положительный сигнал при АСМ-детекции специфических комплексов PrP27–30+анти-PrP МАТ отмечен при анализе лизатов лейкоцитов и фракций клеточных мембран компонентов венозной крови у пациентов с предположительным клиническим диагнозом БКЯ (100% положительных проб). Полученные результаты коррелировали с полученными выше данными АСМ-анализа аутопсий мозга умерших от БКЯ людей, гомогенатов мозга и образцов крови, полученных от лабораторных животных с экспериментальным скрепи (положительные контроли).

Использование данного подхода обеспечило выявление низких концентраций PrP27–30 в биопробах венозной крови у пациентов с болезнью Альцгеймера (22,2% положительных проб). У здоровых доноров и интактных лабораторных животных образование специфических иммунокомплексов PrP27–30+анти-PrP МАТ не выявлено [10].

Предварительные результаты АСМ-анализа образцов венозной крови пациентов, находящихся на лечении в стационаре РНПЦ психического здоровья, представлены в таблице.

Таблица — Результаты АСМ-анализа венозной крови пациентов РНПЦ психического здоровья с нейродегенеративной патологией

| Клинический диагноз | Количество исследуемых пациентов | |
|---|---|---|
| | абс. число | из них положительные/% |
| Болезнь Крейтцфельдта–Якоба, F02.1 | 2 | 2/100,0 |
| Болезнь Альцгеймера, F00 | 9 | 2/22,2 |
| Сосудистая деменция, F01 | 5 | 0/0 |
| Органический амнестический синдром F04 | 4 | 1/25,0 |
| Органическое шизофреноподобное расстройство F06.2 | 2 | 0/0 |
| Шизофрения параноидная, F20.09 | 2 | 0/0 |
| Смешанное тревожное и депрессивное расстройство F41.2 | 1 | 0/0 |
| Конверсионное расстройство моторики F44.4 | 2 | 1/50,0 |

Таким образом, можно заключить, что используя способ АСМ на локально активированной поверхности кремния в нашей модификации впервые в условиях эксперимента в образцах венозной крови у пациентов с различными нейродегенеративными заболеваниями неустановленной этиологии удалось выявить наличие протеазоустойчивого компонента прионнного белка PrP 27–30 и подтвердить ранее поставленный клинический диагноз БКЯ прижизненно (2 случая), обнаружить низкие концентрации PrP 27–30 в клиническом материале у 2 пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера (F00 по МКБ-10), 1 пациента с органическим амнестическим синдромом (F04 по МКБ-10) и 1 пациента с конверсионным расстройством моторики (F44.4 по МКБ-10). Результаты исследований свидетельствуют, что разработанный способ является высокочувствительным и высокоспецифичным, поскольку при АСМ-анализе биообразцов (аутопсия мозга, кровь), полученных от лабораторных животных с экспериментальным скрепи и пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом БКЯ и АЛ, показывает высокую частоту совпадений положительных результатов.

Полученные данные позволяют предлагать данный способ для проведения дальнейших скрининговых исследований среди пациентов с психоневрологическими расстройствами с целью ранней

(прижизненной) детекции PrP27–30. Накопление в крови PrP27-30 в динамике будет основанием для назначения необходимого ухода, лечения и других медицинских процедур, способствующих повышению качества жизни пациента.

**Выводы:**

1) разработан и апробирован новый вариант способа АСМ на локально активированной поверхности кремния для визуализации и идентификации протеазоустойчивого компонента PrP27–30 в анализируемом образце:

- реализованы условия эффективной иммобилизации искомых прионных белков на заданных участках твердой поверхности гидрофильного кремния;
- отработаны условия проведения ферментативной обработки всех протеазочувствительных белков, находящихся на подложке;
- обеспечена специфичность иммунологического взаимодействия PrP27–30 с антиприонными моноклональными антителами.

При этом полосы БСА, деградированные протеолизом, служат поверхностью сравнения для оценки размеров анализируемых биообъектов. Детектирование образованного комплекса «антиген-антитело» доказывает наличие патологического прионного белка в образце;

2) использование способа в данной модификации позволяет производить эффективное выявление PrP27–30 на микронных участках поверхности кремния во фракциях мембран компонентов венозной крови у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями неясного генеза, в т. ч. и при церебральных амилоидозах неустановленной этиологии;

3) способ перспективен как для совершенствования исследований этиопатогенеза прионных болезней, в т. ч. и развития методов прижизненной диагностики прионных инфекций, так и для изучения развития нейродегенеративного процесса в динамике у пациентов с данной патологией при амбулаторном обследовании и в условиях стационара в учреждениях психоневрологического профиля.

**Литература**

1. Prusiner, S.B. Prions / S.B. Prusiner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95:— P. 13363–13383.
2. Update on human prion disease / J.D.F. Wadsworth [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — Vol. 1772. — P. 598–609.
3. Comparative study of electron microscopical techniques for the detection of scrapie-associated fibrils / M.J. Stack [et al.] // Res. Vet. Sci. — 1995. — Vol. 59. — P. 247–254.
4. Application of AFM in microbiology: a review / S. Liu [et al.] // Scanning. — 2010. — Vol. 32, № 2. — P. 61–73.
5. Клаус, Д. Лимфоциты: методы / Д. Клаус: пер.с англ. — М.: Мир, 1990. — 395 с.
6. Нанотехнологические подходы к визуализации и идентификации амилоидных белковых агрегатов при конформационных болезнях человека / С.П. Капитулец [и др.] // Здравоохранение. — 2011. — № 10. — С. 4–9.
7. Новые доказательства прионной природы амиотрофического лейкоспонгиоза / С.П. Капитулец [и др.] // Журн. невропатол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. — 2010. — Т. 110, № 8. — С. 65–71.
8. Способ обнаружения аномальной протеазоустойчивой формы прионного белка (PrPd) при трансмиссивных губкообразных энцефалопатиях человека и животных: пат. а20110013 Респ. Беларусь, МПК7 G 01 N 33/543, G 01 N 33/577 / Г.К. Жавнерко, С.П. Капитулец, И.В. Парибок, Н.Н. Капитулец, Н.Н. Полещук, В.Е. Агабеков; заяв. Ин-т химии новых материалов НАН Беларуси, заявл. 04.01.2011; опубл. 30.08.2012 // Афіц. бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. — 2012. — № 4. — С. 34.
9. Управляемая фиксация конформационно-измененных белков на локально активированной поверхности кремния при нейродегенеративных заболеваниях человека / С.П. Капитулец [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии». — Минск: Белпринт, 2011. — Вып. 4. — С. 186–193.
10. Способ прижизненного обнаружения компонента PrP27–30 патогенной формы прионного белка при церебральных амилоидозах: пат. а20121529 Респ. Беларусь, МПК7 G 01 N 33/543, G 01 N 33/577 / С.П. Капитулец, Г.К. Жавнерко, Н.Н. Капитулец, И.В. Парибок, О.И. Ничипорук, Н.Н. Полещук, Т.В. Докукина, В.А. Горбунов; заяв. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; заявл. 02.11.2012.

## INTRAVITAL DETECTION OF PROTEASE-RESISTANT COMPONENT OF PRION PROTEIN IN BLOOD SAMPLES OF PATIENTS WITH NEUROGENERATIVE DISEASES OF UNKNOWN GENESIS

**Kapitulets S.P.[1], Zavnerko G.K.[2], Nichiporuk J.I.[1], Paribok T.V.[2], Kapitulets N.N.[1], Machrov M.V.[3], Dokukina N.V.[3]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Institute chemistry of new materials NAS of Belarus;*

*[3]Republican Research and Practical Center for Mental Health, Minsk, Belarus*

The article describes a novel method of prion protein detection in blood samples of patients with neurogenerative diseases of unknown genesis. The method includes immobilization of sample on a surface of hydrophilic silicon, fermentative digesting of all protease-sensitive proteins and interaction of protease-tolerant component PrP27–30 with anti-PrP monoclonal antibodies. Generated “antigen-antibody” complex is detected by the atomic-force microscope.

Поступила 02.09.2013

## РОЛЬ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В ГУМОРАЛЬНОМ ОТВЕТЕ ПРОТИВ ЛЕПТОСПИРОЗА У ЧЕЛОВЕКА: ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУННОГО БЛОТТИНГА ПРИ СЕРОДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ

**Капитулец С.П.[1], Ничипорук О.И.[1], Капитулец Н.Н.[1], Азарова И.А.[1], Фидаров Ф.М.[2]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Статья посвящена изучению роли иммунодоминантных белков *Leptospira interrogans* в развитии гуморального иммунного ответа против лептоспироза. Показано, что IgM- и IgG-антитела к основным наружным мембранным липопротеинам LipL32 (32 кДа) и LipL41 (41 кДа) являются доминирующими в сыворотках пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом лептоспироз как на ранние, так и поздние сроки инфекции. Антитела к другим иммунореактивным антигенам лептоспир, выявляемым в иммунном блотинге, имеют важное, но второстепенное значение при серодиагностике заболевания. Полученные данные уточняют патогенетические аспекты лептоспироза у человека. Прогностическая оценка результатов иммунного блоттинга при серодиагностике лептоспироза обсуждается.

**Ключевые слова:** лептоспироз, гуморальный иммунный ответ, антигены, лабораторная диагностика, метод иммунного блоттинга.

**Введение.** Лептоспироз — острое антропозоонозное заболевание с природной очаговостью, характеризуется гематогенной диссеминацией и поражением печени, почек, легких и мозга. Этиологическим агентом болезни являются патогенные виды *Leptospira interrogans*, которых в настоящее время насчитывается около 25 серогрупп (более 250 серовариантов) [1, 2]. Убиквитарное распространение лептоспир определяется выраженной инвазивностью патогена и способностью колонизировать почечные клубочки у многочисленных видов млекопитающих, птиц и человека. Способность к длительному выживанию вне организма также является уникальной среди патогенных спирохет, что определяется наличием в структуре лептоспир определенных белков, обеспечивающих адаптацию к условиям окружающей среды [2]. Данные белки оболочки служат детерминантами патогенеза при лептоспирозе и, очевидно, являются мишенями для гуморального иммунного ответа. В настоящее время многие из основных лептоспирозных иммунореактивных белков уже охарактеризованы. Тем не менее их прогностическое значение при серологической диагностике заболевания остается до конца не определенной [2–6].

**Целью** работы было изучение роли иммунодоминантных белков, выявляемых при лептоспирозе методом иммунного блоттинга, и оценка их прогностического значения для серодиагностики инфекции.

**Материалы и методы.** В работе исследовали 15 противолептоспирозных сывороток, полученных из Республиканского и Минского областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, 10 сывороток пациентов с клиническими симптомами, не исключающими данное заболевание, но негативными в реакции микроагглюютинации — РМА («золотой стандарт»), полученными из больниц г. Минска (ГКИБ, БСМП, 4-я ГКБ и др.), 8 сывороток пациентов с другими заболеваниями: ОРЗ (2), гепатит В (2), герпес (2), хламидиоз (2) и 4 сыворотки здоровых доноров. Все сыворотки исследовали в РМА с 7 серогруппами живых культур *Leptospira interrogans* по стандартной методике [7]. Всего обследовано 37 сывороток крови.

Сыворотки были разделены на 4 группы. Первую группу составили лептоспирозные сыворотки, отобранные в острую фазу на 3–10-й день от начала болезни (n=6) и полученные позднее (фаза реконвалесценции) — спустя 11–35 дней болезни (n=9). Средние интервалы от начала болезни до отбора сывороток составили 6,8±2,4 и 21,3±7,6 дней соответственно. Парные сыворотки для исследования были получены от 3 больных с интервалом 8–15 дней. Вторая группа включала сыворотки от пациентов с клиническими симптомами, не исключающими лептоспироз (n=10). Третью и четвертую группы (отрицательные контроли) составили сыворотки от пациентов с другими инфекционными заболеваниями (n=8) и здоровых доноров (n=4) соответственно. До исследования сыворотки хранили при -20°С.

Антигенные препараты лептоспир для анализа получали из серогрупп *Canicola*, *Grippotyphosa* и I*cterohaemorragiae* как описано [8]. Постановку электрофореза в 12 полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) и иммунный блоттинг (ИБ) проводили по стандартным методикам [9, 10] в нашей модификации [8].

По 100 мкл (приблизительно 10 мкг белка) комплексного антигена из лептоспир 3 серогрупп солюбилизировали в 100 мкл двухкратного буфера образца для электрофореза, содержащего 0,5 М трис-HCl (pH 6.8), 10% глицерин, 10% ДСН, 2,5% 2-меркаптоэтанол, 0,001% бромфеноловый синий). Материал прогревали при 100°С в течение 5 мин в микропланшетном инкубаторе и анализировали ЭФ в ПААГ в недиссоциирующих условиях с использованием коммерческих пластин «NuPage» (Invitrogen, США), содержащих 12% ПААГ, в приборе для мини-электрофореза «XCell SureLock Mini Cell» («Invitrogen» США) [9]. В лунки геля пробы наслаивали в объеме 10 мкл. ЭФ проводили при 200В в течение 45 мин при комнатной температуре до достижения краской нижней границы геля (примерно 1 см). В качестве маркерных белков использовали коммерческую смесь стандартных белков с известной молекулярной массой (М.м) 6500–66000 кДа (M3913, Sigma).

Перенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану PVDF 0,45 мкм (Millipore, Immobilon-P, США) с использованием трис-глицинового буфера с этанолом (9:1) при постоянной силе тока 1 mA/см2 в течение 2 ч при температуре 4°С в приборе для полусухого переноса, модель B 2529 (Sigma Chemical Co, США). Процесс переноса белков контролировали окрашиванием мембраны красителем Ponceau S (P7767, Sigma). Мембрану отмывали буфером TBST (0,05 М трис-HCl; pH 7,4; 0,138 М NaCl; 0,0027 М KCl; 0,05% твин-20) до исчезновения красной окраски. Блокирование неспецифически связывающих участков мембраны проводили блокирующим буфером (5% раствор сухого молока на ФСБ, pH 7,4) в течение 30 мин при комнатной температуре при постоянном помешиванием на качающейся платформе. В качестве первичных антител использовали исследуемые сыворотки групп I–IV в рабочем разведении 1:100. Инкубацию мембраны с сыворотками осуществляли в течение 18 ч при 4°С. Детекцию иммунореактивных антигенов проводили с использованием козьих античеловеческих антител класса IgG (Anti-Human IgG (Fab-specific)-Peroxidase from goat, A0293, Sigma) и IgM (Anti-Human IgM (μ-chain specific)-Peroxidase from goat, A0420, Sigma) в рабочем разведении 1:1000. Реакцию визуализировали субстратной смесью (раствор диаминобензидина 0,5 мг/мл и перекиси водорода 0,5 мг/мл на ФСБ, pH 7,4) до появления полос желто-коричневого цвета. Реакцию останавливали промыванием мембраны водой. После высушивания мембраны на воздухе проводили учет результатов.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что в ИБ с сыворотками пациентов с подтвержденным лабораторно диагнозом лептоспироз (I группа) обнаруживается более 10 отдельных антигенных полос с молекулярными массами (М.м.) 14, 31-, 32-, 37-, 41/42-, 45-, 48-, 54-, 62-, 70-, 76-, 82-кДа и диффузные полосы с М.м. 14- 18, 19-23, 24-30 кДа.

Выраженный IgG-ответ в ИБ против лептоспирозных антигенов отмечен с тремя иммунодоминантными белками р32, р 41/42 (включает по крайней мере две специфичных антигенных полосы с М.м. 41–42 кДа, плохо различаемые в одномерном иммуноблоте [11]), и р62 (таблица 1).

В сыворотках пациентов, находящихся в острой фазе болезни (I группа), антитела класса IgG к иммунодоминантным антигенам р32, р41/42- и р62 отмечены в 33,3–50% случаев. В сыворотках реконвалесцентов эти показатели повышались до 88,9% (8 из 9), 77,8% (7 из 9) и 77,8% (7 из 9) соответственно. В парных сыворотках этой группы в 66,7% (2 из 3) случаев выявлена сероконверсия в отношении реактивности к р32 и р41/42 и только в 33,3% (1 из 3) — к р62. Анти-32 кДа IgG-антитела выявлены также в 3 сыворотках (30%) II группы и только в 1 сыворотке у пациента с гепатитом В (III группа). В сыворотках здоровых доноров (IV группа) IgG антител к р32 не выявлено. Анти-41/42 кДа IgG-ответ был отмечен в 4 сыворотках из 10 в II группе 2 (40%). Напротив, анти-62 кДа IgG-ответ был менее специфичным и достигал 50 и 35,5% реактивности в группах II и III соответственно.

Таблица 1 — Результаты IgG-ИБ с положительными и отрицательными сыворотками на лептоспироз

| Белки, мол. масса | IgG- реактивность сывороток с лептоспирозным антигеном (положительные/всего) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | I группа | | | II группа | III группа | IV группа |
| | острая фаза | фаза реконвалесценции | сероконверсия | | | |
| р82 | 2/6 | 5/9 | | 2/10 | 2/8 | 1/4 |
| р76 | | 6/9 | | 2/10 | 2/8 | |
| р62 | 3/6 | 7/9 | 1/3 | 5/10 | 3/8 | |
| р58 | 1/6 | 1/9 | | 1/10 | 2/8 | |
| р48 | 1/6 | 3/9 | | 2/10 | | |
| р45 | 1/6 | 5/9 | | 2/10 | | 1/4 |
| р41/42 | 3/6 | 7/9 | 2/3 | 3/10 | | |
| р37 | | 4/9 | | 1/10 | | |
| р32 | 2/6 | 8/9 | 2/3 | 3/10 | 1/8 | |
| р31 | | 2/9 | | | | |
| р25 | 1/6 | 1/9 | | | | |
| р20 | 1/6 | | | | | |

Существенная хотя и менее унифицированная реактивность при IgG-ИБ (16,7–33,4% в сыворотках острой фазы и 22,2–55,6% в сыворотках реконвалесцентов I группы) наблюдалась против второй группы антигенов, которые включали р37, р45, р48, р76, и р82 (таблица 1). В заведомо отрицательных сыворотках (группы III и IV) реактивность против каждого из этих пяти антигенов была не выше 25%.

Иммунный IgM-ответ чаще отмечался против низкомолекулярных антигенов, соответствующих лептоспирозным липополисахаридам (ЛПС), в основном в виде диффузных полос с М.м. 14–18, 19–23, 24–30 кДа [11] и практически отсутствовал против высокомолекулярных антигенов как в сыворотках при острой фазе болезни, так и при реконвалесценции. Отмечены редкие исключения: IgM-реактивность к р37 и комбинация антигенных полос с М.м. 35–36 кДа, соответствующих у лептоспир белкам флагилина. IgM-антитела к основным иммунодоминантным белкам лептоспир р32 и р41/42 всегда присутствовали на блотах сывороток, полученных в острой фазе инфекции, и реже (в зависимости от срока заболевания) в фазе реконвалесценции (данные не показаны).

Вследствие наличия значительной гетерогенности IgG-ответа в сыворотках пациентов больных лептоспирозом представляло интерес оценить диагностическую значимость различных комбинаций отдельных иммунореактивных антигенов L.interrogans для лабораторной диагностики заболевания.

Оптимальные комбинации антигенов лептоспир для учета результатов ИБ представлены в таблице 2.

Для сывороток острой фазы при лептоспирозе включение результатов IgG-реактивности антигенов р62 и р76 с иммунодоминантными антигенами р32 и р41/42 повышало чувствительность ме-

тода в 3,6 раза: с 20,0 до 71,4%. Однако вероятность получения ложноположительных результатов при этом увеличивалась в 2.6 раза: с 7,7 до 20%, что связано с уменьшения специфичности ответа на антигены р62 и р76 кДа.

Таблица 2 — Чувствительность IgG-ИБ при анализе иммунореактивности различных комбинаций лептоспирозных антигенов

| Комбинации иммунореактивных антигенов | % сывороток с IgG-реактивностью к лептоспирозным антигенам | | Отрицательные сыворот-ки (n=12)*** |
|---|---|---|---|
| | лабораторно подтвержденные случаи* | ожидаемые случаи ** | |
| Острая фаза (n=6) | | | |
| р32 | 20,0 | 21,4 | 7,7 |
| р32 + р41/42 | 33,3 | 30,8 | 7,7 |
| р32 +р62 | 50,0 | 41,7 | 20,0 |
| р32 + р41/42 + р62 +р76 | 71,4 | 54,5 | 20,0 |
| Фаза реконвалесценции (n=9) | | | |
| р32 | 80,0 | 64,7 | 7,7 |
| р32 + р41/42 | 80,0 | 75,0 | 14,3 |
| р32 + р41/42 + р62 + р76 +р82 | 100,0 | 86,7 | 20,0 |

*диагностическую чувствительность и ложнопозитивность определяли при выявлении положительной реакции с какими либо одним антигеном из комбинации;

**группу составили положительные лептоспирозные сыворотки, реагирующие в РМА с титром ≥50, и сыворотки больных с клиническими симптомами (n=10), не исключающими лептоспироз, но не подтвержденные в РМА;

***заведомо отрицательные сыворотки.

У сывороток фазы реконвалесценции ни одна из комбинаций антигенного ответа значительно не улучшала диагностических показателей IgG-ИБ по сравнению с единственной антигенной полосой (р32). Чувствительность метода при анализе заведомо положительных сывороток достигала 100%, тогда как специфичность только 80% (таблица 2).

Методом ИБ показано, что патогенные виды *L.interrogans* обладают значительным количеством иммунореактивных антигенов, преимущественно белковой природы, которые последовательно экспрессируются в патогенезе инфекции и становятся мишенями для гуморального иммунного ответа. На основании полученных данных можно сделать ряд заключений о прогностическом значении определенных антигенов в серодиагностике лептоспироза: 82 кДа — внутренний мембранный белок. Иммунный ответ против белка высоко специфичен. Чаще регистрируется наличие только IgG-антител против данного антигена. Антиген р82 является типичным маркером поздней или хронической фазы заболевания. Данные антитела очень часто определяются в сыворотке пациентов, страдающих почечно-печеночной недостаточностью при лептоспирозе. В некоторых случаях в острой стадии лептоспироза определяются IgM-антитела против антигена р82. В данной ситуации можно предположить о большой вероятности перехода болезни в хроническое течение; 76 и 62 кДа — белки теплового шока — шапероны DnaK и GroEL соответственно. Эти белки являются неспецифичными для *L.interrogans*, отмечается перекрестная реакция ко множеству других бактерий. Однако выявление антител к данным антигенам имеет диагностическое значение, когда одновременно имеются антитела к антигену р82. Это является подтверждением хронической стадии заболевания. Наличие широких полос на стрипе между 60 и 90 кДа является весомым подтверждением хронической стадии лептоспироза, с вытекающей необходимостью проведения специфической терапии; 58 кДа — общий антиген. Неспецифический антиген. Отмечается высокая частота перекрестных реакций с другими бактериями; 48 кДа — внутренний мембранный белок. Данные о специфичности данного антигена противоречивы, однако выявление антител к данному антигену поддерживает диагноз лептоспироза; 45 кДа — внутренний мембранный белок. Специфический антиген, выявляется у всех патогенных лептоспир; 41/42 кДа — комплекс из 2 белков, включающий наружный мембран-

ный липопротеин LipL41 и внутренний мембранный белок p42. LipL41 является липопротеидом и встроен в наружную мембрану у всех серогрупп лептоспир, что делает его потенциальной мишенью протективного антительного ответа. Доказана высокая частота встречаемости гуморального ответа к LipL41 при лептоспирозе. p41/42 является очень важным и полезным маркером инфекции, поскольку антитела к данному антигену (IgG, IgM) выявляются в ранней стадии заболевания. Например, в ранней стадии лептоспироза во многих случаях отмечается наличие только IgM-антител против антигена p41/42 и высокоспецифичного антигена p25, что позволяет диагностировать раннюю стадию; 37 кДа — специфичность не очень выражена, однако выявление антител к данному антигену поддерживает диагноз лептоспироза; 32 кДа — основной наружный мембранный липопротеин LipL32. Высоко специфичен для *L.interrogans*. Отмечается высокий уровень экспрессии данного антигена всеми известными серогруппами патогенов как в ранней стадии болезни, так и в период реконвалесценции; 31 кДа— наружный мембранный липопротеин LipL45/31. Высоко специфичен для *L.interrogans*; 25 кДа —— трансмембранный наружный мембранный белок OmpL1. Высоко специфичен для *L.interrogans*. Маркер ранней стадии болезни; 14 кДа — наружный мембранный белок. Маркер ранней стадии болезни; 24–30 кДа, 19-23 и 14-18 кДа — диффузные полосы из смеси низкомолекулярных белков и липополисахаридов (ЛПС). Данные о специфичности данных антигенов противоречивы. Маркеры ранней стадии болезни. При выявлении антител только к данным антигенам диагноз лептоспироза не правомочен.

Установлено, что при лептоспирозной инфекции антитела класса IgM и IgG в 90% положительных случаев направлены против наиболее реактивных высокоспецифичных антигенов — LipL32 (p32) и LipL41/42 (p41/42). Благодаря выявлению на блотах антигенов p32 и p41/42 можно быстро оценивать результаты ИБ. При их отсутствии на стрипах обнаружение IgM- и/или IgG-антител против других видоспецифических антигенов лептоспир необязательно должно свидетельствовать о недавно возникшей или перенесенной инфекции.

Следовательно, учет результатов ИБ следует проводить при условии наличия хотя бы 1 из 2 полос антигенов с молекулярной массой 32 кДа и 41/42 кДа и при их отсутствии — 1–2 полос других специфических антигенов (таблицы 3 и 4). Обнаружение IgM и IgG антител против других специфичных антигенов лептоспир при отсутствии антител к p32 и p41/42, не считается достаточным указанием на недавно возникшую и/или перенесенную инфекцию.

Таблица 3 — Референтная оценка результатов анализа по IgG-антителам

| Результат по антителам | | Полосы специфичных антигенов из цельного экстракта: p82, p48, p45, p37, p25 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 2 положительные полосы и более | 1 положительная полоса | нет положительных полос |
| Полосы p32 и/или p41/42 | Положительный | положительный | положительный | положительный |
| | Слабый | положительный | положительный | неопределенный |
| | Отрицательный | положительный | неопределенный | отрицательный |

Таблица 4 — Референтная оценка результатов анализа по IgM-антителам

| Результат по антителам | | Полосы специфичных антигенов из цельного экстракта: p45, p25, p20, p14, диффузные полосы p24–30, p19–23, p14–18 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 2 положительные полосы и более | 1 положительная полоса | нет положительных полос |
| Полосы p32 и/или p41/42 | Положительный | положительный | положительный | положительный |
| | Слабый | положительный | неопределенный | неопределенный |
| | Отрицательный | неопределенный | неопределенный | отрицательный |

Выявление 1 специфической полоски на мембране блота недостаточно для положительной интерпретации теста, однако при наличии на мембране блота также 4 неспецифических полосок вероятность положительного заключения делается высоко вероятной. При наличии на мембране блота широкого спектра полосок выше 60 кДа вместе с одной специфической полоской свидетельствует о диагнозе поздней стадии лептоспироза.

Положительным результатом при IgG-ИБ следует считать:

- наличие на блоте 2 высокоспецифичных полос и 2 неспецифичных полос;
- наличие на блоте 1 высокоспецифичной полосы и 2-4 неспецифичных полос.

Неопределенный результат IgG-ИБ:

- отсутствие высокоспецифичных полосок и наличие 1 и более неспецифичных полосок

Отрицательный результат IgG-ИБ:

- окрашивание антигенных полос отсутствует.

Положительный результат при IgM-ИБ определяется:

- наличием на блотах 2 полос высокоспецифичных антигенов (р32 и р41/42);
- наличием 1 полоски р32 кДа и одной из следующих полос р14, р18, р20, р25, р31, р45, диффузной полосы 14–18, 19–23, 24–30кДа;
- наличием 2 или более высокоспецифичных полос.

Неопределенный результат IgM-ИБ :

- наличие 1 полосы (р32 или р41/42)
- наличие 2 из следующих полосок р45, р25, р20, р14, диффузной полосы 24–30, 19–23, 14–18 кДа

Отрицательный результат IgM-ИБ:

- окрашивание антигенных полос отсутствует.

В заключении следует отметить, что при серологических исследованиях лептоспирозной инфекции определение антител класса IgM часто дает неясные результаты. IgM-антитела могут обнаруживаться спустя годы после возникновения инфекции или после лечения антибиотиками. Поэтому наличие специфических антител класса IgM необязательно указывает на недавнюю инфекцию. В то же время, отрицательный результат по IgM-антителам не исключает наличия свежей инфекции. При повторном заражении человека другими серогруппами патогенных *L.interrogans* могут формироваться только антитела класса IgG, но не IgM.

На поздней стадии лептоспироза положительный результат по IgM-антителам также не дает никакой дополнительной информации. Причина таких ложно положительных результатов часто остается невыясненной. Они могут иметь место, например, при ряде нозоформ: инфекционный мононуклеоз, герпес-вирусные инфекции, разнообразные аутоиммунные заболевания.

Для установления диагноза ранней лептоспирозной инфекции полученный положительный результат по IgM-антителам должен быть обязательно подтвержден через 2–3 недели положительным результатом по антителам класса IgG в свежеотобранном образце крови. При получении неопределенного результата, анализ следует повторить на другом свежеотобранном образце крови через 1–2 недели.

**Выводы:**

1. Гуморальные иммунные ответы против LipL32 (32 кДа) и LipL41 (41 кДа) идентифицированы как наиболее важные серологические маркеры при лептоспирозе Иммунореактивность против других лептоспирозных антигенов значительно не увеличивает диагностическую чувствительность и специфичность метода ИБ;

2. Выявление в ИБ IgM- и IgG-ответов к другим специфическим (р82, р48, р45, р37, р31, р25) и неспецифическим (р76, р62, р58, р14 и др.) антигенам *L.interrogans* при серодиагностике лептоспироза имеет важное прогностическое, но не определяющее значение. Наличие возможной перекрестной реактивности с антигенами других возбудителей ограничивает пригодность их использования;

3. Результаты настоящего исследования являются важными для развития новых стратегий для серодиагностики лептоспироза. Данные свидетельствуют о высоком потенциале метода ИБ для быстрой, простой и точной диагностики болезни как на ранние сроки инфекции, так и верификации диагноза у реконвалесцентов и лептоспироносителей.

**Литература**

1. World Health Organization.. Leptospirosis worldwide // Wkeely Epidemiol. Rec. — 1999. — Vol. 74. — P. 237–242.
2. Levett, P.N. Leptospirosis / P.N. Levett // Clin/ Microbiol/ Rev. — 2001. —Vol. 14. — P. 296–326.
3. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira spp.* / D.A. Haake [et al.] // J. Bacteriol. — 1993. — Vol. 175. — P. 4225–4234.
4. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection / D.A. Haake [et al.] // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68. — P. 2276–2285.
5. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late log-phase growth and mammalian infection / D.A. Haake [et al.] // Infect. Immun. — 1998. — Vol. 66. — P. 1579–1587.
6. Shang, E.S. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira species / E.S. Shang, T.A. Summers, D.A. Haake // Infect. Immun. — 1996. — Vol. 64. — P. 2322–2330.
7. Инструкция о клинике, диагностик, лечении и профилактике лептоспироза / МЗ РБ. — Минск, 2006. — 48 с.
8. Гуморальный ответ против иммунореактивных антигенов при лептоспирозе человека, выявляемый методом иммунного блоттинга / С.П. Капитулец [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 11. — С. 39–44
9. Laemmli U.K. Cleavage of structuralproteinsduringtheassembly of the headof bacteriophageT4 // Nature (London). – 1970. – V.227. – P. 680-685
10. Towbinб H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vщд. 76. — P. 4350–4354.
11. G., Kositanont U., Niwetpathomwat Anuchai et al. Early Diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing / G. Doungchawee [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. — 2008. — Vol. 15, № 3. — P. 492–498.

## ROLE OF IMMUNODOMINANT PROTEINS IN HUMORAL REPONSE AGAINST HUMAN LEPTOSPIROSIS: PROGNOSTIC ESTIMATION OF INFECTION SERODIAGNOSIS BY IMMUNOBLOTTING

**Kapitulets S.P.[1], Nichiporuk O.I.[1], Kapitulets N.N.[1], Azarova I.A.[1], Fidarov F.M.[2]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]State Republican Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health, Minsk, Belarus*

The paper is devoted to study humoral immune response during human leptospirosis as a reporter of protein antigens expressed during infection. Two antigens, p32 and p41/42, were identified as targets of the humoral response during natural infection. In both acute and convalescent phases of illness, antibodies to lipopolysaccharide were predominantly immunoglobulin M (IgM) while antibodies to proteins were exclusively IgG. These findings indicate that leptospiral proteins recognized during natural infection are potentially useful for serodiagnosis of leptospirosis by immunoblotting. Prognostic estimation of immunoblotting results during infection serodiagnosisis discussed.

**Keywords:** leptospirosis, humoral respounce, laboratory diagnosis, immunoblotting.

Поступила 02.09.2013

## ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТАМИ ИНТЕРФЕРОНОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

**Красавцев Е.Л.**

*Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь*

**Резюме.** После окончания терапии препаратами интерферонов наблюдалось 183 пациента с хроническим гепатитом С. Среди пациентов с 1b генотипом HCV устойчивый или длительный вирусологический ответ был лишь у 9,6% больных, у пациентов с другими генотипами HCV — у 38,6%. Чаще устойчивый или длительный вирусологический ответ наблюдался у женщин с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл. Этот ответ встречался при применении высоких начальных доз препаратов интерферонов и при лечении препаратами интерферона и рибавирином примерно с одинаковой частотой у больных с различными генотипами вируса гепатита С.

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит С, генотип вируса, интерферонотерапия, отдаленный вирусологический ответ.

**Введение.** Принимая решение о лечении хронического гепатита С (ХГС) в каждом случае необходимо оценить возможные неблагоприятные прогностические факторы, влияющие на результат противовирусной терапии. Такими, из числа относящихся к характеристике вируса, являются: высокий уровень виремии, наличие HCV-мутантов, 1 генотип HCV (особенно 1b). Неблагоприятные факторы со стороны пациента: мужской пол, возраст старше 50 лет, длительное инфицирование, наличие цирроза печени, низкий исходный уровень аминотрансфераз, гранулы железа, выявленные при морфологическом исследовании ткани печени (высокий уровень сывороточного железа и ферритина), синдром холестаза [1–4]. В настоящее время стандартом терапии является комбинированная терапия Пегилированными формами интерферонов и рибавирином [5]. В то же время в странах, где это достаточно дорогостоящее лечение остается малодоступным большинству пациентов, актуальным является применение для терапии ХГС стандартных препаратов интерферонов с рибавирином.

Поскольку при ХГС частота достижения как первичной, так и стабильной длительной ремиссии на фоне лечения стандартными интерферонами низка, идет активный поиск подходов, которые помогли бы выявить больных с наиболее высокой вероятностью ремиссии [6, 7].

Существуют унифицированные критерии оценки эффективности с выделением биохимического (нормализация АЛТ) и вирусологического ответа (элиминация РНК или снижение титра РНК HCV на 2 порядка и более). При этом выделяют следующие варианты [3]:

1. Ранний ответ — спустя 12 недель от начала терапии.
2. Первичный ответ — на момент завершения лечения.
3. Устойчивый ответ — через 6 мес. после окончания терапии.
4. Длительный ответ — через 12 мес.
5. Не-ответ.
6. Частичный ответ — только биохимический.

**Цель:** определить исходы терапии препаратами стандартных интерферонов у пациентов ХГС различного пола, возраста, с различными генотипами вируса, вирусной нагрузкой, при различных схемах лечения.

**Материал и методы.** После терапии препаратами интерферонов наблюдалось 183 пациентов (64 женщины и 119 мужчин) в возрасте от 3 до 62 лет. Диагноз был подтвержден у всех пациентов обнаружением РНК HCV до начала проведения противовирусной терапии. Препараты ИФН назначались пациентам с 1996 г., когда эти препараты стали применяться в Республике Беларусь для лечения ХГС, и в это время предлагались разнообразные показания и различные схемы лечения. Этим объясняется тот факт, что некоторые пациенты получали ИФН при отсутствии биохимической активности и 6-месячные курсы при неизвестном генотипе вируса гепатита С. Комбинированную терапию с рибавирином получали 57 пациентов. Высокие начальные дозы (6 млн МЕ препаратов ИФН) назначались 79 пациентам, остальные (47) получали стандартную схему лечения ИФН (по 3 млн МЕ 3 раза в неделю). Больных с 1b генотипом HCV среди этих пациентов было 73, с другими генотипами — 44. 66 пациентам генотип HCV не был определен. Вирусная нагрузка определялась у 118 обследуемых. Устойчивый или длительный вирусологический ответ был зарегистрирован у 44 пациентов (24%).

Для сравнения различий в частоте вирусологического ответа в различных группах использовались методы непараметрической статистики ($\chi 2$ и Фишера при использовании таблиц 2×2).

**Результаты и их обсуждение.** Среди пациентов с 1b генотипом HCV устойчивый или длительный вирусологический ответ был лишь у 7 человек из 73 (9,6%). Все эти пациенты были мужчинами. Средний возраст их составил 34,6±3,8 года, до 20 лет среди них был лишь один пациент (14,3±14,3%), а свыше 40 лет — 3 (42,0±20,2%). 6 (85,7±14,3%) пациентов получили лечение в течение 12 мес. и 1 — 6 мес. Высокодозное начало было назначено 3 (42,9±20,2%), комбинированная терапия с рибавирином — 4 (57,1±10,2%) пациентам. Монотерапию не получал ни один пациент с 1b генотипом HCV среди лиц с устойчивым или длительным вирусологическим ответом.

Устойчивый или длительный вирусологический ответ не наблюдался у 66 пациентов с 1b генотипом HCV. Мужчин среди них было 48 (72,7±5,5%), женщин — 18 (27,3 ±5,5%). Средний возраст составил 33,7±1,8 года, пациентов до 20 лет было 12 (18,2±4,8%), старше 40 лет — 23 (34,8±5,9%). В течение 12 мес. лечение получали 25 (37,9±6,0%) пациентов, что статистически значимо реже ($p=0,0404$, $\chi 2=4,2$), чем в группе обследуемых с устойчивым или длительным вирусологическим ответом, в течение 6 мес. — 31 (47,0±6,1%). 10 пациентам (15,1±4,4%) терапия препаратами интерфе-

ронов была отменена после 3 мес. лечения в связи с неэффективностью или непереносимостью. Высокодозное начало было назначено 26 (39,4±6,0%), комбинированная терапия с рибавирином — 27 (40,9,1±6,1%) пациентам. 13 пациентов (19,7 ±4,9%) препараты интерферона получали виде монотерапии. У 23 пациентов наблюдался ранний вирусологический ответ, а у 12 — первичный вирусологический ответ.

Среди пациентов с другими генотипами HCV устойчивый или длительный вирусологический ответ был у 17 человек из 44 (38,6%). Среди них мужчин было 8 (43,7±12,4%), женщин — 9 (56,3±12,4%). Средний возраст их составил 29,6±2,3 года, до 20 лет среди них было два пациента (11,8±8,1%), а свыше 40 лет — 4 (23,5±10,6%). 14 пациентов (82,4±9,5%) получили лечение в течение 12 мес. и 3 (17,6±9,5%) — 6 мес. Высокодозное начало было назначено 8 (47,1±12,5%), комбинированная терапия с рибавирином — 8 (47,1±12,5%) пациентам. Монотерапию получал лишь один больной в этой группе. У одного пациента был зарегистрирован ранний вирусологический не-ответ.

Устойчивый или длительный вирусологический ответ не наблюдался у 27 больных с другими генотипами HCV. Мужчин среди них было 20 (74,1±8,6%), женщин 7 (25,9 ±8,6%). Средний возраст составил 30,3±2,1 года, больных до 20 лет было 3 (11,1±6,2%), старше 40 лет — 4 (14,8±7,0%). В течение 12 мес. лечение получали 10 (37,0±9,5%) пациентов, в течение 6 мес. — 9 (33,3±9,2%). 8 пациентам (29,6±9,0%) терапия препаратами интерферонов была отменена после 3 мес. лечения в связи с неэффективностью или непереносимостью. Высокодозное начало было назначено 12 (44,4±9,7%), комбинированная терапия с рибавирином — 7 (25,9±8,6%) пациентам. 8 пациентов (29,6±9,0%) препараты интерферона получали в виде монотерапии. У 13 пациентов наблюдался ранний вирусологический ответ, а у 6 — первичный вирусологический ответ. Статистически значимых отличий с группой пациентов с устойчивым или длительным вирусологическим ответом не наблюдалось.

Среди обследуемых, у которых генотип HCV не был определен, устойчивый или длительный вирусологический ответ был у 20 человек из 66 (30,3%). Среди них мужчин было 7 (35,0±10,9%), женщин — 13 (65,0±10,9%). Средний возраст их составил 28,65±2,8 года, до 20 лет среди них было 4 пациента (20,0±9,2%), а свыше 40 лет — 3 (15,5±8,2%). Лечение в течение 12 мес. получали 17 (85,0±8,2%) пациентов и 3 (15,0±8,2%) — 6 мес. Высокодозное начало было назначено 7 (35,0±10,9%), комбинированная терапия с рибавирином — 2 (10,0±6,7%) пациентам. Монотерапию получали 11 пациентов (55,0±11,4%) в этой группе. У одного пациента был зарегистрирован ранний вирусологический не-ответ и еще у одного — первичный вирусологический не-ответ.

Устойчивый или длительный вирусологический ответ не наблюдался у 46 пациентов, у которых генотип HCV не был определен. Среди них был 31 мужчина (67,4±6,9%), женщин — 15 (32,6±6,9%). Женщин среди этих пациентов регистрировалось статистически значимо меньше ($p=0,0144$, $\chi2=5,99$), чем среди пациентов с устойчивым или длительным вирусологическим ответом. Средний возраст составил 28,6±1,5 года, пациентов до 20 лет было 6 (13,0±5,0%), старше 40 лет — 9 (19,6±5,8%). В течение 12 мес. лечение получали 18 (39,1±7,2%) пациентов, что статистически значимо реже ($p=0,0172$, $\chi2=5,68$), чем в группе с устойчивым или длительным вирусологическим ответом, в течение 6 мес. — 16 (34,8±7,0%). Терапия препаратами интерферонов была отменена после 3 мес. лечения 12 пациентам (26,1±6,5%) в связи с неэффективностью или непереносимостью. Высокодозное начало было назначено 23 (50,0±7,4%), комбинированная терапия с рибавирином — 4 (8,7±4,2%) пациентам. 19 пациентов (41,3±7,3%) препараты интерферона получали в виде монотерапии. У 20 пациентов наблюдался ранний вирусологический ответ, а у 8 — первичный вирусологический ответ. У 4 пациентов, у которых устойчивый или длительный вирусологический ответ не наблюдался непосредственно после лечения, спустя несколько лет при повторном исследовании РНК HCV не обнаруживалась.

Устойчивый или длительный вирусологический ответ после лечения препаратами интерферонов наблюдался как у пациентов с отрицательными результатами выявления РНК HCV на фоне лечения, так и с положительными. Отрицательные результаты при обнаружении РНК HCV во время лечения не всегда соответствовали устойчивому или длительному вирусологическому ответу после окончания лечения. К устойчивому или длительному вирусологическому ответу достоверно чаще приводили 12-месячные курсы терапии (в 40,2±5,1% случаев, $p=0,0001$, $\chi2=15,58$), чем 6-месячные (11,1±4,0%). Чаще устойчивый или длительный вирусологический ответ наблюдался у женщин (37,3±6,3%, у мужчин —18,5±3,6%, $p=0,0062$, $\chi2=7,49$).

Считается, что уровень вирусной нагрузки HCV выше 500 000 копий/мл является неблагоприятным фактором для прогноза эффективности терапии препаратами интерферонов [9].

Эффективность интерферонотерапии больных ХГС с различной вирусной нагрузкой (более и менее 500 000 копий/мл) представлена в таблице 1.

Ранний вирусологический ответ у пациентов с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл наблюдался у 56 из 84 (66,7%), а у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл — у 25 из 34 (73,5%). У 44 из 68 обследуемых с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл (64,7%) регистрировался первичный вирусологический ответ, а у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл этот ответ был отмечен у 18 из 23 (78,3%). Устойчивый или длительный вирусологический ответ статистически значимо чаще ($p=0,0325$, $\chi2=4,57$) наблюдался у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл (у 8 из 19, 42,1%), чем у пациентов с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл (у 10 из 56, 17,9%).

Таблица 1 — Эффективность интерферонотерапии пациентов с различной вирусной нагрузкой

| Ответ на интерферонотерапию | Вирусная нагрузка | |
|---|---|---|
| | Менее 500 000 копий/мл | Более 500 000 копий/мл |
| Ранний ВО, % | 73,5±7,6<br>25/34 | 66,7±5,1<br>56/84 |
| Первичный ВО, % | 78,3±8,8<br>18/23 | 64,7±5,8<br>44/68 |
| Устойчивый или длительный ВО, % | 42,1±11,6*<br>8/19 | 17,9±5,1<br>10/56 |

Примечание. Статистически значимые различия между группами больных ХГС отмечены * ($p<0,05$).

Нами проведено сравнение эффективности интерферонотерапии у больных ХГС с 1b генотипом и другими генотипами HCV при различной вирусной нагрузке (таблица 2 и 3)

Таблица 2 — Эффективность интерферонотерапии с 1b генотипом HCV с различной вирусной нагрузкой

| Ответ на интерферонотерапию | Вирусная нагрузка | |
|---|---|---|
| | Менее 500 000 копий/мл | Более 500 000 копий/мл |
| Ранний ВО, % | 46,2±14,4<br>6/13 | 52,4±7,7<br>22/42 |
| Первичный ВО, % | 50±22,4<br>3/6 | 50±8,8<br>16/32 |
| Устойчивый или длительный ВО, % | 12,5±12,5<br>1/8 | 10,7±5,6<br>3/28 |

Таблица 3 — Эффективность интерферонотерапии пациентов с другими генотипами HCV с различной вирусной нагрузкой

| Ответ на интерферонотерапию | Вирусная нагрузка | |
|---|---|---|
| | Менее 500 000 копий/мл | Более 500 000 копий/мл |
| Ранний ВО, % | 94,1±5,9<br>16/17 | 80,1±6,2<br>34/42 |
| Первичный ВО, % | 85,7±9,7<br>12/14 | 77,8±6,9<br>28/36 |
| Устойчивый или длительный ВО, % | 62,5±18,3<br>5/8 | 28,0±9,2<br>7/25 |

Ранний вирусологический ответ у пациентов с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл наблюдался у 22 из 42 (52,4%), а у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл — у 6 из 13 (46,2%). У 16 из 32 пациентов с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл (50,0%) регистриро-

вался первичный вирусологический ответ, а у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл этот ответ был отмечен у 3 из 6 (50,0%). Устойчивый или длительный вирусологический ответ у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл наблюдался у 1 из 8 (12,5%), а у пациентов с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл – у 3 из 28 (10,7%).

Ранний вирусологический ответ у пациентов с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл наблюдался у 34 из 42 (80,1%), а у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл — у 16 из 17 (94,1%). У 28 из 36 обследуемых с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл (77,8%) регистрировался первичный вирусологический ответ, а у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл этот ответ был отмечен у 12 из 14 (85,7,3%). Устойчивый или длительный вирусологический ответ чаще наблюдался у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл (у 5 из 8, 62,5%), чем у таковых с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл (у 7 из 25, 28,0%).

Статистически значимых отличий в эффективности интерферонотерапии у пациентов с 1b ХГС и другими генотипами HCV с различной вирусной нагрузкой в разные сроки лечения выявлено не было.

У больных ХГС с 1b генотипом при анализе результатов лечения на сроке 3 месяца при монотерапии препаратами интерферонов ранний вирусологический ответ наблюдался у 2 из 11 пациентов (18,2%), которым удалось провести определение РНК HCV в эти сроки. Ранний биохимический ответ отмечался в этой группе у 6 из 9 больных (66,7%). В группе больных с высокодозным началом интрферонотерапии ранний вирусологический ответ был зарегистрирован у 14 из 16 пациентов (87,5%), которым проводилось вирусологическое исследование в эти сроки, а ранний биохимический ответ — у 3 из 10 больных (30,0%). При комбинированной терапии (интерферон+рибавирин) ранний вирусологический ответ наблюдался у 10 (55,5%) пациентов из 18, которым в эти сроки проводилось это исследование, а биохимический ответ — у 9 (69,2%) из 13. Таким образом, ранний вирусологический ответ статистически значимо чаще достигался в группе пациентов с высокодозным началом интрферонотерапии, чем в при монотерапии препаратами интерферонов (p=0,0033, точный критерий Фишера), и при комбинированной терапии (p=0,0463, точный критерий Фишера). Также статистически значимыми были отличия и между пациентами при применении комбинированной терапии и при монотерапии препаратами интерферонов по достижению раннего вирусологического ответа (p=0,0005, точный критерий Фишера).

При анализе результатов лечения при монотерапии препаратами интерферонов первичный вирусологический ответ (к окончанию терапии) определялся у 1 из 7 пациентов (12,5%), биохимический — у 3 из 9 (33,3%). В группе больных с высокодозным началом интрферонотерапии первичный вирусологический ответ был зарегистрирован у 11 из 15 (73,3%) пациентов, которым проводилось определение РНК HCV в эти сроки, а первичный биохимический ответ регистрировался у 6 пациентов из 10 (60,0%). Первичный вирусологический ответ наблюдался при комбинированной терапии у 5 (27,8%) больных из 13, которым в эти сроки проводилось это исследование, а биохимический ответ — у 9 (69,2%) из 13, которым проводилось это исследование.

Устойчивый или длительный вирусологический ответ (через 6 мес. и более после окончания терапии) при монотерапии препаратами интерферонов не наблюдался ни у одного пациентов из 14, причем у 4 пациентов с вирусологическим ответом на фоне лечения после завершения курса интерферонотерапии вновь выявлялась РНК HCV. Биохимический ответ в эти сроки был зарегистрирован в этой группе только у двух пациентов из 7 (28,6%). В группе больных с высокодозным началом интрферонотерапии устойчивый или длительный вирусологический ответ определялся у 3 больных из 16 (18,75%).

Так же, как и при монотерапии препаратами интерферонов, не было соответствия вирусологического обследования на фоне лечения и после его завершения. Так, устойчивый или длительный вирусологический ответ был у 2 больных, у которых РНК HCV выявлялась на фоне лечения, и, наоборот, у 3 пациентов, у которых не было РНК HCV на фоне лечения, после её завершения она определялась. Устойчивый или длительный вирусологический прослеживался у 18 пациентов при комбинированной терапии. У 4 (22,2%) был вирусологический ответ, и ещё у 14 РНК HCV продолжала определяться.

У больным ХГС с другими генотипами HCV при анализе результатов лечения на сроке 3 мес. при монотерапии препаратами интерферонов ранний вирусологический ответ наблюдался у 6 из 10 пациентов (60,0%), которым удалось провести определение РНК HCV в эти сроки. Ранний биохи-

мический ответ отмечался в этой группе у 4 из 5 обследованных (80,0%). В группе пациентов с высокодозным началом интрферонотерапии ранний вирусологический ответ был зарегистрирован у 19 из 20 пациентов (95,0%), которым проводилось вирусологическое исследование в эти сроки, а ранний биохимический ответ — у 6 из 8 больных (75,0%). При комбинированной терапии ранний вирусологический ответ наблюдался у 11 (84,6%) пациентов из 13, которым в эти сроки проводилось это исследование, а биохимический ответ — у 8 (80,0%) из 10. Таким образом, ранний вирусологический ответ статистически значимо чаще достигался в группе с высокодозным началом интрферонотерапии, чем при монотерапии препаратами интерферонов (p=0,0312, точный критерий Фишера).

При анализе результатов лечения при монотерапии препаратами интерферонов первичный вирусологический ответ определялся у 3 из 6 пациентов (50,0%), биохимический — у 4 из 4 (100%). В группе с высокодозным началом интрферонотерапии первичный вирусологический ответ был зарегистрирован у 17 из 20 (85,0%) пациентов, которым проводилось определение РНК HCV в эти сроки, а первичный биохимический ответ регистрировался у 8 пациентов из 9 (88,9%). Первичный вирусологический ответ наблюдался при комбинированной терапии у 12 (85,7%) больных из 14, которым в эти сроки проводилось это исследование, а биохимический ответ — у 8 (80,0%) из 10, которым проводилось это исследование. Устойчивый или длительный вирусологический ответ при монотерапии препаратами интерферонов наблюдался у 4 больных из 11 (36,4%). В группе с высокодозным началом интерферонотерапии устойчивый или длительный вирусологический ответ определялся у 8 пациентов из 16 (50,0%). Устойчивый или длительный вирусологический прослеживался у 17 пациентов при комбинированной терапии. У 10 (58,8%) был вирусологический ответ, и ещё у 7 РНК HCV продолжала определяться. Биохимический ответ в эти сроки был у 4 пациентов (80,0%) из 5, которые сдавали биохимический анализ в эти сроки, другие пациенты проводили только вирусологические исследования. Так же, как и у пациентов с 1b генотипом HCV, не было соответствия вирусологического обследования на фоне лечения и после его завершения.

**Выводы.** Среди пациентов с 1b генотипом HCV устойчивый или длительный вирусологический ответ был лишь у 9,6%. У пациентов с другими генотипами HCV устойчивый или длительный вирусологический ответ регистрировался у 38,6%.

К устойчивому или длительному вирусологическому ответу достоверно чаще приводили 12-месячные курсы терапии (в 40,2±5,1% случаев, p=0,0001, $\chi 2$=15,58), чем 6-месячные (11,1±4,0%). Чаще устойчивый или длительный вирусологический ответ наблюдался у женщин (37,3±6,3%, у мужчин — 18,5±3,6%, p=0,0062, $\chi 2$=7,49).

Устойчивый или длительный вирусологический ответ статистически значимо чаще (p=0,0325, $\chi 2$=4,57) наблюдался у пациентов с вирусной нагрузкой менее 500 000 копий/мл (42,1%), чем у больных с вирусной нагрузкой более 500 000 копий/мл. (17,9%).

Ранний и первичный вирусологический ответ наблюдался статистически значимо чаще при применении высоких начальных доз, чем при лечении препаратами интерферона и рибавирином и при применении монотерапии у пациентов с 1b генотипом HCV. Ни в одном случае не был достигнут устойчивый или длительный вирусологический ответ при лечении пациентов с 1b генотипом HCV при применении интерферонотерапии в виде монотерапии, в то время как при высокодозном начале и комбинированной терапии этот ответ встречался с примерно одинаковой частотой. Первичный и устойчивый или длительный вирусологический ответ встречался чаще при применении высоких начальных доз и при лечении препаратами интерферона и рибавирином, чем при монотерапии у пациентов с другими генотипами HCV.

**Литература**

1. Карпов, В.В. Хронический гепатит С / В.В. Карпов // Иммунология, аллергология, инфектология. — 2000. — № 2. — С. 55–74.

2. Соринсон, С.Н. Вирусные гепатиты / С.Н. Соринсон.— 2-е изд. — СПб., 1997. — 280 с.

3. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C // J. Hepatol. — 1999. — Vol.30, Suppl № 2. — P. 956–961.

4. Hoomagle, J.H. The treatment of chronic viral hepatitis / J.H. Hoomagle, A.M. Di Bisceglie // N. Engl. J. Med. — 1997. — Vol. 336, № 5. — P. 347–356.

5. Барбакадзе, Г.Г. Лечение пегилированным интерфероном-α больных хроническим гепатитом С / Г.Г. Барбакадзе, Г.В. Пипия, Г.К. Камкамидзе // Терапевт. архив. — 2005. — № 1. — С. 73–75.

6. Майер, К.П. Гепатит, последствия гепатита / К.П. Майер; пер. с нем. А.А. Шептулина. — М.: Гэотар Медицина, 1999. — 159 с.

7. Serologic response against hepatitis C virus as a predictive factor to the treatment with interferon / A. Garrido [et al] // Enferm. Infec. Microbiol. Clin. — 2000. — Vol. 18, № 10. — P. 512–515.
8. Майер, К.П. Гепатит и последствия гепатита: практ. рук. К.П. Майер. — 2–е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2004. — 720 с.

## LONG-RUN RESULTS OF TREATMENT WITH INTERFERON PREPARATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

**Krasavtsev E.L.**

*Gomel State Medical University, Gomel, Belarus*

After the end of interferon therapy 183 patients were observed. Among patients with HCV 1b genotype the sustained or prolonged virologic response was observed only in 9.6%, among patients with other HCV genotypes — in 38.6%. The sustained or prolonged virologic response was more common in women and in those patients with viral load below 500.000 copies/ml. The sustained or prolonged virologic response was more commonly seen in patients on high initial interferon doses regimen, and in those on combined interferon and ribavirin therapy with approximately equal frequency in different HCV genotypes.

**Keywords:** chronic viral hepatitis C, viral genotype, interferon therapy, long-run virologic response.

Поступила 06.09.2013

## ОЦЕНКА ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПИЕЛОНЕФРИТОВ И ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ УРОПАТОГЕНОВ

**Лагун Л.В., Тапальский Д.В.**

*Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь*

**Резюме.** В этиологической структуре пиелонефритов преобладали штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*. Оценена устойчивость возбудителей пиелонефритов к антибиотикам, изучены механизмы антибиотикорезистентности энтеробактерий. Выявлена высокая распространенность продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра, относящихся к группе CTX-M. Среди возбудителей пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты P. aeruginosa. Штаммы, выделенные от больных хроническим пиелонефритом и пиелонефритом, протекающим на фоне уролитиаза, по способности формирования биопленок значительно превосходили штаммы, выделенные от больных острым пиелонефритом. У штаммов *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей активностью отмечена более высокая устойчивость к антибактериальным препаратам. Полученные в ходе исследования данные об этиологической структуре пиелонефритов, способности возбудителей формировать биопленки, уровнях и механизмах устойчивости уропатогенов к антибактериальным препаратам могут использоваться для разработки алгоритма микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов.

**Ключевые слова:** острые и хронические пиелонефриты, возбудители пиелонефритов, резистентность к антибиотикам, β-лактамазы расширенного спектра, биопленки.

**Введение.** Среди всех заболеваний человека по частоте пиелонефрит занимает второе место после острых респираторных заболеваний и является одной из наиболее распространенных форм поражения почек у детей и взрослых [1, 2]. Наиболее частыми возбудителями пиелонефритов являются энтеробактерии, главным образом — *Escherichia coli*, на долю которой приходится до 85% всех заболеваний, а также *Proteus spp.* и *Klebsiella pneumoniae*. Достаточно большой удельный вес в структуре уропатогенов занимает *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Вид и характер инфекции имеют большое значение в этиопатогенезе пиелонефрита и назначении рациональной антибиотикотерапии [2, 3]. Поэтому изучение этиологической роли микроорганизмов в развитии и течении пиелонефритов по-прежнему остается актуальным.

Одним из факторов патогенности микроорганизмов является образование биопленок. С их образования также начинается развитие любой инфекции, в том числе и инфекции мочевыделительной системы (пиелонефрит, цистит, мочекаменная болезнь) [4]. Для практической медицины

особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии факторов иммунной защиты макроорганизма и антибиотиков. Таким образом, существование биопленок при инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике и лечению.

В последнее время резистентность энтеробактерий к ряду антибиотиков, особенно β-лактамным, приобретает все большее распространение, что является серьезной проблемой здравоохранения. Продукция β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) — один из наиболее распространенных и клинически значимых механизмов резистентности энтеробактерий к современным β-лактамным антибиотикам. Однако эффективность выявления устойчивости, связанной с продукцией БЛРС, с помощью традиционных методов оценки чувствительности остается крайне низкой [5, 6]. Для проведения эффективной эмпирической антибактериальной терапии инфекций мочевыводящих путей, в частности пиелонефрита, необходима информация не только о распространенности антибиотикорезистентности, но и ее основных механизмах.

**Целью** настоящей работы явилось сравнительное исследование этиологической структуры и молекулярно-биологических свойства возбудителей пиелонефритов.

**Материалы и методы.** В исследование включено 273 клинических изолятов (102 — *E. coli*, 83 — *P. aeruginosa*, 63 — *Proteus spp.*, 15 — *S. aureus*, 10 — *K. pneumoniae*), выделенных в 2005–2010 гг. из мочи пациентов с острым и хроническим пиелонефритом. Все пациенты находились на стационарном лечении в урологическом и детском нефрологическом отделениях Гомельской областной клинической больницы. Дополнительно изучена первичная медицинская документация 345 больных пиелонефритами за период 2000–2003 гг. и 297 — за период 2008–2010 гг., на основе данных которой проведен ретроспективный анализ этиологической структуры пиелонефритов в Гомельской областной клинической больнице.

Определение минимальных подавляющих концентраций антибиотиков для 49 штаммов *E. coli*, 47 штаммов *P. aeruginosa*, 35 штаммов *Proteus spp.*, выделенных из мочи в 2005–2008 гг., и для 32 штаммов *E. coli*, 36 штаммов *P. aeruginosa*, 28 штаммов *Proteus spp.*, выделенных из мочи в 2009–2010 гг., проводили методом серийных разведений в агаре. Диапазон разведений антибиотиков 0,25–128 мкг/мл. Контроль качества определения антибиотикочувствительности проводился с использованием контрольных штаммов E. coli ATCC 25922 и P. aeruginosa ATCC 27853.

С использованием метода «двойных дисков» выполнен фенотипический скрининг продукции БЛРС для 65 штаммов *E. coli*, 35 штаммов *Proteus spp.*, 10 штаммов *K. pneumoniae* с различными профилями резистентности к антибактериальным препаратам. Параллельно с анализом испытуемых культур исследовали контрольные штаммы: *E. coli* ATCC 25922 — отрицательный контроль (БЛРС–); *K. pneumoniae* ATCC 700603 — положительный контроль (БЛРС+).

Для выявления генов БЛРС различных классов (TEM, OXA, SHV, CTX-M) проведена полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Определена групповая принадлежность БЛРС классов TEM, SHV и CTX-M в мультиплексной ПЦР в реальном времени с последующей оценкой температур плавления зондов, позволяющей выявлять точечные мутации, придающие расширенный спектр бета-лактамазной активности в соответствующих кодонах генов. Для ПЦР-тестирования отобраны 49 культур с подтвержденным БЛРС-фенотипом (*E. coli* — 29 штаммов, *K. pneumoniae* — 5 штаммов, *Proteus spp.* — 15 штаммов).

Для количественной оценки интенсивности формирования микробных биопленок уропатогенами в исследование включено 150 исследуемых штаммов (69 *E. coli*, 56 *P. aeruginosa*, 15 *S. aureus*, 10 *K. pneumoniae*). Для исследования из суточных культур штаммов готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд, вносили в пробирки типа эппендорф с бульоном. После инкубации бульонную культуру удаляли и вносили в них по 1 мл 1% раствора генцианвиолета (ГЦВ) для окрашивания сформированных биопленок; инкубировали при 37°С 30 мин. Удалив раствор ГЦВ из эппендорфов, для экстракции краски из биопленки вносили по 1 мл 96% этанола. Для построения калибровочной кривой готовили контрольные образцы (спиртовые растворы ГЦВ с концентрацией 2, 10, 25 и 50 мг/л). Контрольные и опытные образцы вносили в лунки 96-луночного планшета; измерение концентраций ГЦВ проводили на иммуноферментном анализаторе АИФ-М/340, длина волны 570 нм.

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакета прикладных программ STATISTICA v.6.0. Для определения статистической значимости отличий между группами рассчитывали критерий значимости Стьюдента (t), вероятность значений разницы (p). Для оценки

различия частоты встречаемости признаков использован χ2-критерий Пирсона и соответствующий ему уровень значимости. Статистически значимыми считали результаты при уровне p<0,05.

**Результаты и их обсуждение.** При проведении ретроспективного анализа этиологической структуры пиелонефритов в Гомельской областной клинической больнице установлено, что в структуре уромикрофлоры больных пиелонефритом в 2000–2003 гг. и 2008–2010 гг. доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (эшерихия, протей, энтеробактер, клебсиелла, цитробактер, морганелла), среди которых первое место по частоте занимала *E. coli* (рис. 1).

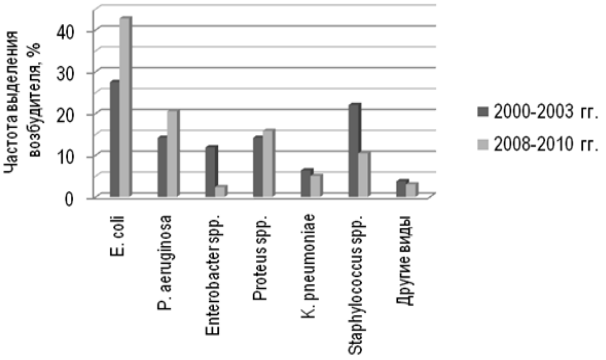



Рисунок 1 — Сравнительная характеристика этиологической структуры пиелонефритов

Частота выделения штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa* увеличивается в 1,5 раза в 2008–2010 гг. по сравнению с 2000–2003 гг. Удельный вес штаммов *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.* в 2008–2010 гг. снижается по сравнению с 2000–2003 гг. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* (p=0,0001), *P. aeruginosa* (p=0,034), *Staphylococcus spp.* (p=0,0001), *Enterobacter spp.* (p<0,0001). Удельный вес штаммов *Proteus spp.* и *K. pneumoniae* на протяжении 10 лет изменяется незначительно, что подтверждается отсутствием значимых отличий для этих штаммов (p>0,05).

При использовании метода серийных разведений в агаре на основе полученных данных проведен анализ динамики антибиотикочувствительности возбудителей пиелонефритов, выделенных в 2005–2008 гг. и в 2009–2010 гг. Сравнительные характеристики чувствительности клинических изолятов *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa* к антибиотикам представлены в таблице 1 и на рисунке 2.

Таблица 1 — Сравнительная характеристика антибиотикочувствительности штаммов *E. coli* и *Proteus spp.* в 2005–2008 гг. и 2009–2010 гг.

| Антибиотик | *E. coli* | | *Proteus spp.* | |
|---|---|---|---|---|
| | 2005–2008 гг. (n=49), % | 2009–2010 гг. (n=32), % | 2005–2008 гг. (n=35), % | 2009–2010 гг. (n=28), % |
| Амоксициллин | 18,4±5,5 | 31,3±8,2 | 28,6±7,6 | 35,7±9,1 |
| Амоксиклав | 71,4±6,4 | 68,8±8,2 | 77,2±7,1 | 64,3±9,1 |
| Цефотаксим | 59,2±7,0 | 62,5±8,5 | 74,3±7,4 | 60,7±9,2 |
| Цефтазидим | 44,9±7,1 | 62,5±8,5 | 74,3±7,4 | 64,3±9,1 |
| Цефепим | 53,0±7,1 | 81,3±6,9 | 82,9±6,4 | 60,7±9,2 |
| Имипенем | 93,9±3,4 | 100,0 | 91,4±4,7 | 96,4±3,5 |
| Ампициллин/ сульбактам | 59,2±7,0 | 62,5±8,5 | 80,0±6,8 | 67,9±8,8 |
| Ципрофлоксацин | 79,6±5,7 | 75,0±7,6 | 82,9±6,4 | 60,7±9,2 |
| Гентамицин | 65,4±6,8 | 62,5±8,5 | 54,3±8,4 | 50,0±9,4 |
| Амикацин | 83,7±5,3 | 93,8±4,3 | 82,9±6,4 | 75,0±8,2 |

При сравнении данных по чувствительности штаммов *E. coli* за 5-летний период отмечается значительное повышение частоты чувствительности к цефепиму на 28,3% (p=0,0097), сохраняется чувствительность к имипенему (93,9–100%), амикацину (93,8%), цефепиму (81,3%), ципрофлоксацину (75,0%) (p>0,05). Защищенные пенициллины, цефалоспорины III поколения, гентамицин не-

значительно уступают по активности этим препаратам. Практически неактивным против штаммов *E. coli* был амоксициллин. Выявлена тенденция к росту чувствительности *E. coli* к цефтазидиму, но на имеющейся выборке статистически значимых различий не установлено. На протяжении 5 лет отмечено незначительное изменение чувствительности штаммов *E. coli* к амоксициллин/ клавуланату, ампициллин/ сульбактаму, цефотаксиму, ципрофлоксацину, гентамицину (p>0,05).

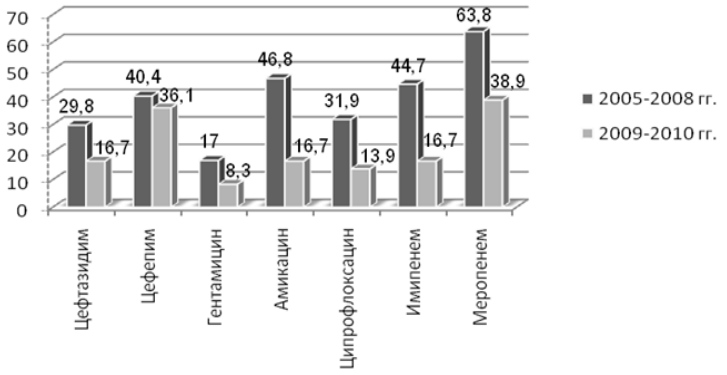



Рисунок 2 — Сравнительная характеристика антибиотикочувствительности штаммов *P. aeruginosa* в 2005–2008 гг. (n=47) и 2009–2010 гг. (n=36), %

За период с 2005–2008 гг. по 2009–2010 гг. отмечается снижение чувствительности *Proteus spp.* к цефалоспоринам III–IV поколения (на 10,0–22,2%). Однако статистически значимые различия из цефалоспоринов выявлены только в активности цефепима (p=0,049). Также в 2009–2010 гг. отмечается снижение чувствительности *Proteus spp.* к аминогликозидам (на 4,3–7,9%), и ингибиторозащищенным β-лактамам (на 12,1–12,9%); статистически значимых различий не выявлено (p>0,05). Количество ципрофлоксацин-чувствительных штаммов *Proteus spp.* уменьшилось с 82,9 до 60,7% (p=0,049). Результаты показывают, что штаммы *Proteus spp.* за 5-летний период сохраняют чувствительность к имипенему.

На протяжении 2005–2010 гг. отмечается невысокая активность антибактериальных препаратов в отношении *P. aeruginosa*. В основном отмечена тенденция к увеличению количества резистентных штаммов к 2009–2010 гг. Активность карбапенемов в отношении P. aeruginosa традиционно считалась высокой. Однако наблюдается достоверное снижение числа чувствительных штаммов P. aeruginosa для имипенема с 44,7% в 2005–2008 гг. до 16,7% в 2009–2010 гг. (p=0,007), для меропенема с 63,8 до 38,9% (p=0,024), амикацина с 46,8 до 16,7% (p=0,004), ципрофлоксацина с 31,9 до 13,9% (p=0,047). В то же время значимых отличий в частоте встречаемости чувствительных штаммов P. aeruginosa, выделенных в 2005–2008 гг. и 2009–2010 гг., к цефтазидиму, цефепиму и гентамицину не выявлено.

С использованием метода «двойных дисков» продукция БЛРС выявлена у 29 из 65 (44,6%) штаммов *E. coli*. В предыдущих испытаниях, выполненных с помощью стандартного диско-диффузионного метода [7], устойчивость к цефотаксиму и цефтазидиму обнаруживалась только у 58,6% БЛРС-продуцирующих штаммов, устойчивость только к цефотаксиму — у 20,7% штаммов, устойчивость только к цефтазидиму — у 13,8% штаммов. 2 штамма *E. coli* (6,9%) с подтвержденной продукцией БЛРС при предварительном исследовании диско-диффузионным методом были отнесены к категории «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму.

Продукция БЛРС была выявлена у 5 (50,0%) штаммов *K. pneumoniae*. Из них 2 штамма ранее были охарактеризованы как «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму при использовании стандартного диско-диффузионного метода [7]. Продукция БЛРС была выявлена у 15 (42,9%) штаммов *Proteus spp.* (у 2 из них стандартный диско-диффузионный метод не позволил обнаружить устойчивости к цефтазидиму и цефотаксиму). Для всех штаммов с подтвержденной продукцией БЛРС отмечено увеличение диаметров зон подавления роста при добавлении клавулановой кислоты (синергизм) в отношении обоих цефалоспоринов.

При проведении геноиндикации БЛРС ни у одного из 49 исследуемых штаммов энтеробактерий БЛРС класса ОХА не обнаружены. У 38 из 49 штаммов амплифицировался участок гена blaTEM, однако нуклеотидных замен в 104 позиции, придающих БЛРС-активность, выявлено не было (WT, дикий тип). У всех исследованных штаммов *Proteus spp*. и *E. coli* (не зависимо от наличия или отсутствия фенотипически определяемой БЛРС-активности) гены blaSHV не детектировались. Обнаружены blaSHV-гены у изолятов K. pneumoniae, относящиеся к генетической группе SHV-1 (плазмидно-кодируемые пенициллиназы SHV-1), не обладающие расширенным спектром активности в отношении бета-лактамных антибиотиков.

У 14 штаммов *E. coli*, 8 штаммов *P. mirabilis* и 5 штаммов *K. pneumoniae* обнаружен продукт амплификации длиной около 97 п.н. с температурой плавления 82,8–83,0°С. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (генетическая группа CTX-M-1). У 2 штаммов *E. coli* обнаружен продукт амплификации длиной 518 п.н. с температурой плавления 91°С. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (генетическая группа CTX-M-9).

Проводя количественную оценку интенсивности формирования биопленок уропатогенами выявили, что все клинические изоляты *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* обладали выраженной способностью к образованию биопленок. Для изолятов *E. coli* концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных растворах находились в диапазоне 3,35–17,11 мг/л, *K. pneumoniae* — 4,45–18,79 мг/л, *P. aeruginosa* — 3,36–56,0 мг/л, *S. aureus* — 4,21–7,74 мг/л.

Среди возбудителей острых и хронических пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали штаммы *P. aeruginosa*, пленкообразующая способность которых в 2–3 раза превосходила способность к формированию биопленок у штаммов энтеробактерий и стафилококков. Для изолятов, выделенных от больных хроническими пиелонефритами, обнаружено значительное преобладание пленкообразующей активности по сравнению с микроорганизмами, выделенными при острых пиелонефритах. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* ($p<0,0001$), *P. aeruginosa* ($p<0,0001$), *K. pneumoniae* ($p=0,0222$), *S. aureus* ($p=0,0279$). Возбудители, выделенные от больных пиелонефритами с сопутствующей мочекаменной болезнью, в целом отличались большей способностью к пленкообразованию, по сравнению с возбудителями инфекций, протекающих без уролитиаза; различия статистически значимы для энтеробактерий ($p = 0,0011$), отсутствие статистически значимых различий для штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* возможно связано с небольшим объемом выборки.

На основе данных пленкообразующей активности возбудителей пиелонефритов определены средние значения (M±m) массы красителя для исследуемых микроорганизмов: *E. coli* — 6,50±0,34, *K. pneumoniae* — 9,49±1,5, *P. aeruginosa* — 18,25±1,15. Выявлены ряд штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* с максимальной и минимальной биопленкообразующей способностью, у которых проанализировали профили антибиотикорезистентности для выявления взаимосвязи между способностью штаммов к пленкообразованию и антибиотикорезистентностью. Установили, что штаммы *E. coli*, *P. aeruginosa* с максимальной биопленкообразующей способностью обладали сочетанной устойчивостью ко многим, чаще 6–7 антибиотикам. В отношении штаммов *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей способностью антибактериальные препараты более активны — профили резистентности имели место только к 4 антибиотикам. Клинические изоляты *E. coli* с минимальной биопленкообразующей способностью зачастую устойчивы к 1–3 антибиотикам, реже — к 4 препаратам; в некоторых случаях такие штаммы *E. coli* не имели устойчивости к антибактерильным препаратам. В отношении же штаммов *K. pneumoniae* с минимальной биопленкообразующей способностью отмечена устойчивость к 1–2 антибиотикам, *P. aeruginosa* — к 2–4 антибиотикам.

**Выводы.** Таким образом, в современных условиях спектр выделяемых возбудителей пиелонефритов кардинально не изменился, однако, отмечено увеличение частоты выделения штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, и снижение количества штаммов *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.* Установлена широкая распространенность устойчивости энтеробактерий к β-лактамным и не-β-лактамным антибиотикам. На протяжении 2005–2010 гг. отмечается невысокая активность антибиотиков в отношении *P. aeruginosa* с тенденцией к увеличению количества резистентных штаммов к 2009–2010 гг., что требует пересмотра схем рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов. У 44,6% штаммов *E. coli*, 50% штаммов *K. pneumoniae* и 42,9% штаммов *Proteus spp.* с использованием фе-

нотипического метода выявлена продукция БЛРС. Причем 12,2% БЛРС-позитивных штаммов ранее были охарактеризованы как «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму при использовании стандартного диско-диффузионного метода. В связи с этим для тестирования таких штаммов показано использование дополнительных тестов (метод «двойных дисков»), выявляющих устойчивость к антибиотикам, опосредованную продукцией БЛРС. Установлено, что БЛРС-активность исследуемых штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *K. pneumoniae* опосредована наличием генов CTX-M.

Среди возбудителей пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Преобладание пленкообразующей активности обнаружено для штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенных от больных хроническими пиелонефритами и с сопутствующей мочекаменной болезнью. Таким образом, способность к формированию биопленки определяется как видом возбудителя, так и характером инфекционного процесса. Выявлено, что *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей активностью более устойчивы к антибиотикам, чем штаммы с минимальной способностью формировать биопленки. Таким образом, способность к формированию биопленки обеспечивает возбудителям пиелонефритов повышение устойчивости к антибиотикам, требует пересмотра принципов терапии хронических инфекций мочевыделительной системы с внедрением методов, направленных на предотвращение формирования или разрушение уже сформированной биопленки.

**Литература**

1. Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbility, and economic cost / B. Foxman // Am. J. Med. — 2002. — Vol. 113, Suppl. 1. — P. 5–13.

2. Перепанова, Т.С. Инфекции почек и мочевыводящих путей: современные подходы к терапии / Т.С. Перепанова // Фарматека. — 2004. — № 3/4. — С. 16–22.

3. Яровой, С.К. Эмпирическая терапия пиелонефрита / С.К. Яровой, Н.Л. Шимановский, Е.Н. Карева // Урология. — 2010. — № 2. — С. 21–27.

4. Update on biofilm infections in the urinary tract / P. Tenke [et al.] // World J. Urol. — 2012. — Vol. 30. — P. 51–57.

5. Страчунский, Л.С. β-Лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза / Л.С. Страчунский // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерап. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 92–96.

6. Paterson, D.L. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update / D. L. Paterson, R.A. Bonomo // Clin. Microbiol. Rev. — 2005. — Vol. 18, № 4. — P. 657–686.

7. Лагун, Л.В. Алгоритм рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов и его микробиологическое обоснование / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский // Пробл. здоровья и экологии. — 2012. — № 4. — С. 62–69.

## ESTIMATION OF ETIOLOGIC STRUCTURE OF PYELONEPHRITISES AND STUDY OF MOLECULAR-BIOLOGICAL QUALITY OF UROPATHOGENS

**Lagun L.V., Tapalski D.V.**

*Gomel State Medical University, Gomel, Belarus*

A total of 273 clinical strains of microorganisms isolated in 2005–2010 years from urine of patients with acute and chronic pyelonephritis are included in to the research. Retrospective analysis of etiologic structure of pyelonephritises for periods of years 2000–2003 and of years 2008–2010 is performed. In etiologic structure of pyelonephritises is prevailed *E. coli* and *P. aeruginosa*. Resistance of etiologic agents of pyelonephritises to antibiotics of various groups was evaluated. High prevalence of extended-spectrum β-lactamases producers concerning to CTX-M group was revealed. Among etiological agents of pyelonephritis the maximum film-forming ability P. aeruginosa isolates are possessed. The strains isolated from patients with chronic pyelonephritis and pyelonephritis proceeding with urolithiasis have surpassed in ability biofilm formation than the strains isolated from patients with acute pyelonephritis. Higher resistance to antibacterial agents is revealed for microorganisms *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* with maximum intensity of biofilm formation. Data obtained during study about etiologic structure of pyelonephritises, ability to biofilm formation of clinical isolates, levels and resistance mechanisms of uropathogens to antibacterial agents may be use for development algorithm of microbiological diagnostics and rational antibacterial therapy of pyelonephritises.

**Keywords:** acute and chronic pyelonephritises, etiologic agents of pyelonephritises, resistance to antibiotics, extended-spectrum beta-lactamases, biofilms.

Поступила 04.09.2013

# ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПЦР ДЛЯ СЕРОТИПИРОВАНИЯ *NEISSERIA MENINGITIDIS* ПО ШЕСТИ СЕРОГРУППАМ: A, B, C, Y, W135 И 29E

**Лебедев Ф.А., Титов Л.П.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В статье представлены данные исследований по подбору праймеров и оптимизации условий их амплификации с целью разработки метода мультиплексной ПЦР по определению серогрупповой принадлежности *N. meningitidis* шести серогрупп: A, B, C, Y, W135 и 29E.

При разработке метода использовали контрольные штаммы типовых культур менингококков, а при лабораторной апробации клинические изоляты *N. meningitidis*, полученные в период 2011–2013 гг. из региональных лабораторий (n=56), реидентифицированных в референс-лаборатории и находящихся в коллекции РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

С целью амплификации были выбраны серогруппоспецифичные внутренние фрагменты генов — *mynA* (A), *siaD* (B, C, Y), *cap29EH (29E)* и *synG (W135)*. В результате проведенных предварительных серий экспериментов подобраны шесть пар праймеров, которые разделены на две смеси. При определении серогруппы с одной культурой (пробой ДНК) ставятся две реакции со смесями праймеров. Концентрации реагентов и режимы амплификации для удобства постановки реакции унифицированы. Чувствительности разработанного метода мультиплексной ПЦР составляет $10^3$ ГЭ/мл.

**Ключевые слова:** серогруппа, ПЦР, амплификация, *N. meningitidis.*

**Введение.** *Neisseria meningitidis* является одной из главных причин септицемии и менингита во всем мире: случаи менингококковой инфекции регистрируются повсеместно и составляют 1–3 на 100 тыс. населения в развитых и 10–25 на 100 тыс. в развивающихся странах. Менингококковая инфекция является значимой проблемой практического здравоохранения вследствие способности вызывать массовые вспышки, с выраженной тяжестью течения, высокого уровня смертности, сложностью диагностики [1]. У 54% переболевших менингитом людей развиваются неврологические осложнения, включая глухоту, задержку умственного развития, умственную отсталость. В Республике Беларусь около 70–80% всех умерших от менингококковой инфекции лиц являются дети первых 2-х лет жизни, у которых наблюдались генерализованные формы заболевания с развитием инфекционно-токсического шока [2].

По серологической активности, которая определяется капсульным полисахаридом, менингококки внутри вида подразделяются на серогруппы: A, B, C, H, I, K, L, M, X, Y, Z, 29E и W135 [1]. Следует отметить, что изоляты менингококков, принадлежащие к пяти из них (A, B, C, W135 и Y), вызывают генерализованные формы инфекционного заболевания более чем у 90% всех случаев менингококковой инфекции. Вместе с тем, имеют место менингококковые назофарингиты и здоровое носительство (4–12% населения), частота которых существенно возрастает в эпидемический период и при сезонном подъеме заболеваемости (февраль – март – апрель). Выделяемые от бактерионосителей штаммы менингококков (5–15 %) не имеют капсулы и являются серологически нетипируемыми [3].

Серогруппа A менингококков считается наиболее распространенной в области «менингитного пояса», но также встречаются случаи менингококковой инфекции, вызванные менингококками серогруппы C, реже серогруппами X и W135. Менингококки серогруппы A в настоящее время редко встречаются при менингококковой инфекции в странах Европы и США, более часто они выделяются у здоровых носителей, хотя при возникновении эпидемий всегда преобладают менингококки серогруппы A [3, 4].

Менингококки серогруппы B являются важнейшей проблемой, поскольку они являются основным источником инвазивных болезней в Европе и США, Австралии, Новой Зеландии, а также Беларуси, и в данное время против них нет эффективной вакцины. При генерализованной менингококковой инфекции, обусловленной возбудителями серогруппы B, летальность в 3–5 раз выше, чем при заболеваниях, вызванных возбудителями серогрупп A, C или Y [5]. Так, в Минске выделенные менингококки распределились следующим образом: B — 61,2%, A — 10,2%, C —10,2%, нетипируемые —18,4%; в Брестской области: B — 46,5%, A — 10,9%, C — 10,7%, нетипируемые — 24,5%, W135 — 2,4%, 29E — 3%, Y — 1,8%, X — 0,3% [6].

Серологическое группирование менингококков проводится после окончательной видовой идентификации возбудителя, что обусловлено общими антигенными факторами менингококков с непатогенными нейссериями. Проведение серологического группирования менингококков является обязательным для практических лабораторий, как одна из мер эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией. Кроме того, проведение серотипирования необходимо для планирования мер иммунопрофилактики, а также химиопрофилактики поскольку известна корреляция антибиотикорезистентности менигококков с их серогрупповой принадлежностью [7, 8].

С дугой стороны известны штаммы менингококков, имеющие нестандартный полисахарид - так называемые нетипируемые и полиагглютинабельные, в результате чего подобные штаммы не поддаются рутинному серологическому серотипированию с использованием антисывороток. Данные штаммы, как правило, реагируют с антисыворотками сразу против нескольких групповых полисахаридных антигенов. Так, штаммы, выделенные из носоглоточной слизи, в половине случаев не поддаются группированию в реакции агглютинации по причине полиагглютинабельности или аутоагглютинации. Поэтому разработка молекулярно-генетического метода определения серогрупповой принадлежности менингококков является актуальной [7, 8].

Вариации в генах хромосомного капсульно-генного комплекса ответственны за капсульно-полисахаридные различия серогрупп *N. meningitidis*. Типичный капсульно-генный комплекс этих бактерий состоит из областей A, B, C, D и E. Области A и C находятся между генами *galE* и *tex* и транскрибируются независимо. Гены, находящиеся в области A, ответственны за синтез полисахарида. Гены области B, включающие *lipA* и *lipB*, вовлечены в процессы транслокации и экспрессии поверхностных полимеров. Область C содержит четыре гена (*ctrA, -B, -C и -D*), которые необходимы для связи капсулы с мембраной. Область D состоит из кассеты генов, включающей *rmlA, -B, -C* и *galE*. Данная кассета не вовлечена в синтез капсулы, но ответственна за биосинтез липополисахарида. Область E содержит только один ген (*tex*), который, предполагается, регулирует синтез липополисахарида. Последовательности генов в области A у каждой серогруппы индивидуальны, в то же время последовательности генов в областях B, C, D и E достаточно консервативны для всех серогрупп [9, 10].

**Цель** исследования — дизайн/подбор праймеров, формирование эффективной реакционной смеси, оптимизация условий амплификации и детекции ампликонов мультиплексной ПЦР для определения основных клинически значимых серогрупп *N. meningitidis*: A, B, C, Y, W135 и 29E.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований послужили 56 образцов ДНК менингококков (серогрупп A, B, C, Y, W135), выделенных от пациентов, контактных лиц и бактерионосителей в различных регионах страны в 2011–2013 гг. Также в работе использовались следующие контрольные штаммы менингококка: ATCC 13077 *N. meningitidis* (*serogroup A*), NCTC 10026 *N. meningitidis* (*serogroup B*), ATCC 13102 *N. meningitidis* (*serogroup C*), NCTC 11202 *N. meningitidis* (*serogroup 29E*) NCTC 11203 *N. meningitidis* (*serogroup W135*), ATCC 35561 *N. meningitidis* (*serogroup Y*).

Экстракцию ДНК из культур менингококков проводили коммерческим набором реагентов «ДНК-экспресс» (производитель — НПФ «Литех», Москва). Данный метод является достаточно эффективным и позволяет выделять до 3,0±0,25 пг. ДНК из 105 КОЕ. Согласно инструкции производителя, пробирку с образцом и реактивом «ДНК-экспресс» встряхивали на вортексе и помещали в твердотельный термостат, прогретый до 98°C, на 10 мин. После прогрева пробирки переносили в высокоскоростную микроцентрифугу и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант использовали в качестве источника ДНК для постановки амплификации.

В работе использовался амплификатор «Терцик», ДНК-Технология (Россия). Условия ПЦР реакции: 95°C — 5 мин, 35 циклов: 95°C — 60 с, 55°C — 40 с и 72°C — 30 с, элонгация 72°C — 10 мин.

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. В нее входили растворы праймеров F и R с конечной концентрацией 10 пмоль, 2,5 мкл 10 х ПЦР-буфера, 2 мкл 25ммоль раствора $MgCl_2$, 0,5 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед/мкл Taq-полимеразы, вода до объема 25 мкл.

Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, pH 8,5 с добавлением бромистого этидия. ПЦР-продукт вносили в лунки геля, для контроля размера синтезированных фрагментов использовали молекулярно-весовой маркер ДНК 100–1500 п.н. Электрофорез проводили при 110В в течение 40 мин. ДНК фрагменты идентифицировали в ультрафиолетовом излучении с использованием трансиллюминатора. Учет проводили по появлению специфической полосы на расстоянии, соответствующем длине пробега синтезируемого фрагмента ДНК.

Ввод, статическую обработку и анализ данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel версия 7.0 и Статистика версия 6.0 ($p<0,05$).

**Результаты и их обсуждение.** При подборе праймеров была проанализирована литература [9–11] и опытным путем были отобраны 6 пар праймеров для постановки мультиплексной ПЦР (с разделением на две смеси). Для ПЦР анализа генов *N. meningitidis*, определяющих серогрупповую принадлежность менингококков для амплифицикации были выбраны внутренние фрагменты генов *mynA* (A), *siaD* (B, C, Y), *cap29EH (29E)* и *synG (W135)*. Последовательности праймеров приведены в таблице 1. Специфические «серогрупповые» праймеры распознают следующие гены менингококков: *mynA* для серогруппы A — ген, кодирующий уридиндифосфат-N-ацетил-d-глюкозамин-2-эпимеразу, ответственную за синтез капсулы; *siaD* для серогрупп B, C и Y — ген, кодирующий полисиалилтрансферазу-D, различную для каждой серогруппы; *synG* для серогруппы W135 — полимеразу, *cap29EH* для серогруппы 29E — D-арабиноза-5-фосфатизомеразу.

Таблица 1 — Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генов *N. meningitidis*

| Ген | Последовательность праймеров 5'-3' | Размер продукта |
|---|---|---|
| *mynA(A)* | GCCAGAGGAAGCAAATAGGCGTT<br>GAGCGGAATCACAAAAGAGAATGTTG | 349 п.н. |
| *siaD(B)* | GGATCATTTCAGTGTTTTCCACCA<br>GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA | 450 п.н. |
| *siaD(Y)* | CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA<br>CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA | 120 п.н. |
| *siaD(C)* | TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT<br>CAATCACGATTTGCCCAATTGAC | 250 п.н. |
| *synG(W135)* | ACGGTATCTGATGAAATGCTG<br>TCATATACAACGATTGGAATATC | 476 п.н. |
| *cap29EH(29E)* | TTGGCGGTTGAAACCTTAC<br>GCGTATCATGCTCCATTACCA | 694 п.н. |

К каждой паре праймеров подбирались индивидуальные условия ПЦР реакции, обеспечивающие оптимальный результат конкретной реакции. Так как задачей данного исследования являлась разработка мультиплексной ПЦР для одновременного определения шести серогрупп менингококка, данные пары праймеров были сгруппированы в две смеси по три пары праймеров каждая: смесь A-B-Y (*mynA*(A), *siaD*(B), *siaD*(Y) и смесь C-W135-29E (*siaD*(C), *synG*(W135), *cap29EH*(29E).

Концентрации и состав компонентов реакционной смеси в ПЦР для определения серогрупп менингококков представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Концентрации и состав компонентов реакционной смеси

| Реакция на A-B-Y | Объем/ концентрация | Реакция на C-W135-29E | Объем/ концентрация |
|---|---|---|---|
| Праймер *mynA*(A) (F) | 10 пМ/мкл[1] | Праймер *siaD*(C) (F) | 10 пМ/мкл[1] |
| Праймер *mynA*(A) (R) | 10 пМ/мкл[1] | Праймер *siaD*(C) (R) | 10 пМ/мкл[1] |
| Праймер *siaD*(B) (F) | 10 пМ/мкл[1] | Праймер *synG*(W135) (F) | 10 пМ/мкл[1] |
| Праймер *siaD*(B) (R) | 10 пМ/мкл[1] | Праймер *synG*(W135) (R) | 10 пМ/мкл[1] |
| Праймер *siaD*(Y) (F) | 10 пМ/мкл[1] | Праймер *cap29EH*(29E) (F) | 10 пМ/мкл[1] |
| Праймер *siaD*(Y) (R) | 10 пМ/мкл[1] | Праймер cap29EH(29E) (R) | 10 пМ/мкл[1] |
| Taq полимераза (5 ед./мкл) | 0,2 мкл | Taq полимераза (5 ед./мкл) | 0,2 мкл |
| 10*ПЦР буфер с $(NH_4)_2SO_4$ | 2,5 мкл | 10*ПЦР буфер с $(NH_4)_2SO_4$ | 2,5 мкл |
| Смесь нуклеотидов (dNTP Mix) (10 мМ) | 0,5 мкл | Смесь нуклеотидов (dNTP Mix) (10 мМ) | 0,5 мкл |
| Раствор $MgCl_2$ (25 мМ) | 2 мкл | Раствор $MgCl_2$ (25 мМ) | 2 мкл |
| Раствор ДНК | 1–10 мкл | Раствор ДНК | 1–10 мкл |
| $H_2O$ для ПЦР | _[2] | $H_2O$ для ПЦР | _[2] |

Примечания.

1. _[1] — указана финальная концентрация в реакционной смеси;
2. _[2] — вода добавляется в объеме, необходимом до доведения общего объема реакционной смеси до 25 мкл.

После приготовления ПЦР смеси в пробирку добавлялось 20 мкл (капля) минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе амплификации. Параллельно с опытными пробами ставился отрицательный контроль. Отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо ДНК вносится соответствующее количество воды для ПЦР. Отрицательный контроль необходим для проверки ингредиентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключить учет ложноположительных результатов.

Пробирки переносились в программируемый амплификатор, и проводилась амплификация в автоматическом режиме по заданной программе. Для удобства использования метода подобраны универсальные условия амплификации для всех праймеров.

Пример результатов постановки мультиплексной ПЦР с шести серогруппами *N. meningitidis*: A, B, C, Y, W135 и 29E (рисунок 1).

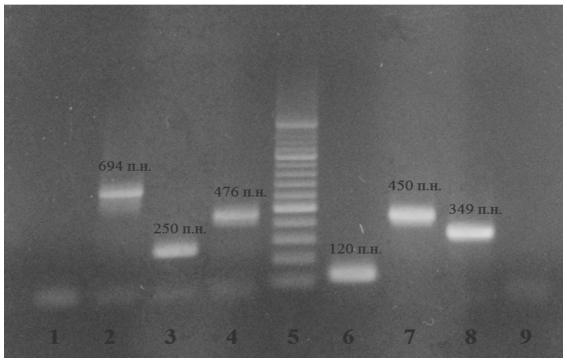



Рисунок 1 — Электрофореграмма результата постановки мультиплексной ПЦР с 6 серогруппами *N. meningitidis:* (Лунки 1–4 смесь C-W135-29E: лунка 1 — отрицательный контроль смеси C-W135-29E; лунка 2 — ампликон гена *cap29EH*(29E) — 694 п.н.; лунка 3 — ампликон гена *siaD*(C) — 250 п.н.; лунка 4 — ампликон гена *synG*(W135) — 476 п.н.; лунка 5 — маркер молекулярного веса (100–1500 п.н.); лунки 6 – 9 смесь A-B-Y: лунка 6 — ампликон гена *siaD*(Y) — 120 п.н.; лунка 7 — ампликон гена *siaD*(B) — 450 п.н.; лунка 8 — ампликон гена *mynA*(A) – 349 п.н.; лунка 9 — отрицательный контроль смеси A-B-Y)

При оценке чувствительности мультиплексной ПЦР оценивали чувствительность каждой пары праймеров по реакции с ГЭ менингококка определенной серогруппы в диапазоне $10^1$–$10^6$ ГЭ. Чувствительность реакций варьировала от $10^2$–$10^3$ ГЭ: $10^2$ ГЭ — для праймеров *siaD*(Y), *siaD*(C), *mynA*(A), $10^3$ ГЭ — для праймеров *cap29EH*(29E), *synG*(W135), *siaD*(B) (рисунок 2). Чувствительности мультиплексной ПЦР принята равной $10^3$ ГЭ/мл. На рисунке 2 представлен пример оценки чувствительности ПЦР к гену *mynA*.

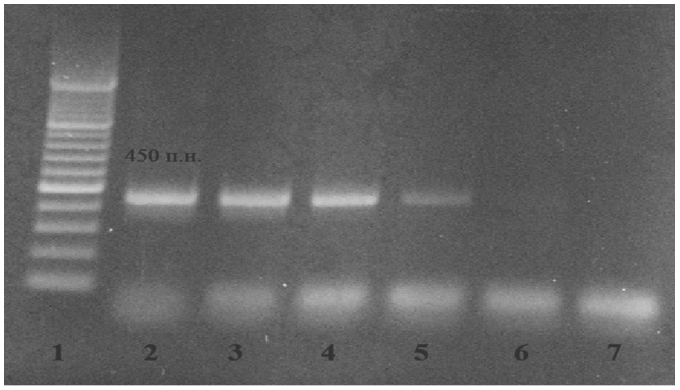



Рисунок 2 — Электрофореграмма чувствительности праймеров *siaD*(B): лунка 1 — маркер молекулярного веса (100–1500 п.н.); лунка 2 — $10^6$ ГЭ/мл; лунка 3 — $10^5$ ГЭ/мл; лунка 4 — $10^4$ ГЭ/мл; лунка 5 — $10^3$ ГЭ/мл, лунка 6 — $10^2$ ГЭ/мл; лунка 7 — $10^1$ ГЭ/мл

Проведено серотипирование 56 изолятов менингококков (серогрупп A, B, C, Y, W135), выделенных от пациентов, контактных лиц и бактерионосителей, поступивших в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии из различных областей Беларуси в 2011–2013 гг. Все культуры (n=56) менингококка успешно серотипированы данным методом: 47 культур (84%) — серогруппа B, 4 (7%) — серогруппа C, 3 (5%) — серогруппа A, 1 (2%) — серогруппа Y, 1 (2%) — серогруппа W135.

**Выводы:**

1. Разработан метод мультиплексной диагностической ПЦР для определения шести мажорных серогрупп N. meningitidis: A, B, C, Y, W135 и 29E, условия амплификации и концентрации реагентов для удобства метода унифицированы. Чувствительность метода составила $10^3$ ГЭ/мл.

2. Метод апробирован на 56 изолятах менингококков (серогрупп A, B, C, Y, W135), выделенных от пациентов, контактных лиц и бактерионосителей в различных регионах Беларуси в 2011–2013 гг.: 47 культур (84%) — серогруппа B, 4 (7%) — серогруппа C, 3 (5%) — серогруппа A, 1 (2%) — серогруппа Y, 2 (1%) — серогруппа W135.

3. Метод может быть рекомендован в качестве альтернативы методу латекс-агглютинации.

**Литература**


1. Khatami, A. The epidemiology of meningococcal disease and the impact of vaccines / A. Khatami, A.J. Pollard // Exp. Rev. Vaccines. — 2010. Vol. 9. — P. 285–298.
2. Молекулярно - генетический мониторинг Neisseria meningitidis на территории Республики Беларусь (2006–2010) / С.Э. Глазкова [и др.] // Здравоохранение. — 2011. — № 11. — С.10–14.
3. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of Neisseria meningitidis from the Czech Republic, Greece, and Norway / S.P. Yazdankhah [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42, № 11. — P. 5146–5153.
4. Racloz, V.N. The elusive meningococcal meningitis serogroup: a systematic review of serogroup B epidemiology / V.N. Racloz, S.J.D. Luiz2 // BMC Infect. Dis. — 2010. — Vol. 10. — P. 175.
5. Giorgini, D. Molecular typing of Neisseria meningitidis serogroup A using the polymerase chain reaction and restriction endonuclease pattern analysis / D. Giorgini, M.K. Taha // Mol. Cell. Probes. — 1995. — Vol. 9. — P. 297–306.
6. Матвеев, В.А. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика менингококковой инфекции у детей. Возможности УЗ-исследований при выявлении контингента, особо угрожаемого по развитию молниеносной менингококкемии : учеб.-метод. пособие / В.А. Матвеев, Г.Я. Хулуп; МЗ РБ, БелМАПО, Кафедра инфекционных болезней.
7. Глазкова, С.Э. Молекулярно-биологический мониторинг *N. meningitidis*, циркулирующих среди населения республики / С.Э. Глазкова, Ф.А. Лебедев, Л.П. Титов // Актуальные вопросы внутренних болезней: материалы XII съезд терапевтов Респ. Беларусь, Гродно, 17–18 мая 2012 г. — Гродно, 2012. — С. 204–205.
8. Титов, Л.П. Менингококковая инфекция: современное состояние проблемы / Л.П. Титов // Здравоохранение. — 2010. — № 12. — С. 15–23.
9. Development of a multiplex PCR assay for detection and genogrouping of *Neisseria meningitidis* / Zhu Hongfei [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2011. — Vol. 50. — P. 46–51.
10. Use of a new single multiplex PCR-based assay for direct simultaneous characterization of six *Neisseria meningitidis* serogroups / Ch. Fraisier [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2009 .— Vol. 47, № 8. — P. 2662–2666.
11. Полимеразная цепная реакция в диагностике менингококкового менингита / В.П. Малый, Н.В. Винникова, П.В. Нартов // Международ. мед. журн. — 2010. — Т. 16, № 1. — С. 86–90.


## OPTIMIZATION OF DIAGNOSTIC PCR METHOD FOR SEROTYPING *NEISSERIA MENINGITIDIS* TO SIX SEROGROUPS: A, B, C, Y, W135 И 29E


**Lebedev F.A., Titov LP.**

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



The article presents research findings on the option of primers and optimization of amplification conditions for the development of multiplex PCR method for *N. meningitidis* serotyping to 6 serogroups: A, B, C, Y, W135 and 29E.

In developing the method there were used Type Culture meningococcal control strains as well as clinical meningococcal isolates, obtained in the period 2011–2013 from regional laboratories (n=56).

As targets for PCR there were used serogroup specific internal fragments of the following genes — *mynA*(A), *siaD*(B, C, Y), *cap29EH (29E)* and *synG (W135)*.



**Keywords:** serogroup, PCR, amplification, *N. meningitidis*.

Поступила 02.09.2013

# АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ СМЕШАННЫХ РОТАВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ У ДЕТЕЙ

**Ляховская Н.В., Дмитраченко Т.И., Семенов В.М., Крылова Е.В.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** Описана этиологическая структура смешанных ротавирусно-бактериальных кишечных инфекций у детей, предложены алгоритмы антибактериальной терапии с учетом чувствительности бактериальных возбудителей к антибиотикам, возраста пациента и его анамнестических данных. Оценена эффективность патогенетической терапии смешанной ротавирусно-бактериальной инфекции.

**Ключевые слова:** ротавирусная инфекция, смешанная ротавирусно-бактериальная инфекция.

По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 1 млрд случаев «диарейных» заболеваний, 65–70% из которых поражают детей и чаще, чем у взрослых характеризуются более тяжелым и затяжным течением болезни, приводящем к развитию неблагоприятных исходов [1, 2]. В последние годы отмечается тенденция в изменении этиологической структуры патогенов, вызывающих острые кишечные инфекции (ОКИ) у детей [3]. Этиологическими агентами 50–80% диарей являются вирусы, ведущую роль среди которых играет ротавирус [4, 5]. В настоящее время специфические антиротавирусные средства отсутствуют, поэтому основу лечения составляет патогенетическая терапия. В то же время в некоторых рекомендациях по лечению ротавирусной инфекции (РВИ) в состав базисной терапии включены и антимикробные препараты [6]. По данным российских исследований, несмотря на отсутствие антибиотиков в составе большинства официально рекомендуемых схем терапии при РВИ, антибактериальную терапию получают 16–42% пациентов с установленной ротавирусной инфекцией [7]. Это во многом объясняется, во-первых, преобладанием в числе пациентов детей раннего возраста, а также возможностью сочетанной ротавирусно-бактериальной инфекции (РВИ/БИ), которая в значительной мере меняет клиническую картину, свойственную каждой из составляющих ее нозологических единиц, увеличивая частоту вовлечения в процесс толстого кишечника, что не характерно для моно ротавирусной инфекции (МРВИ).

Так как этиология заболевания устанавливается, как правило, ретроспективно и выбор терапии при лечении пациентов, страдающих инфекционной диареей, не может быть направлен на лечение конкретной нозологической формы, при определении тактики лечения врач, в первую очередь, основывается на механизме диареи, которая определяется топикой поражения ЖКТ и характером диареи. При этом тактика терапии существенно отличается при инвазивной и водянистой, включающей секреторную и осмотическую, диареях. В такой ситуации оптимизация методов лечения ОКИ не теряет своей актуальности.

**Целью** работы явилось обоснование выбора антибактериальной терапии при смешанной ротавирусно-бактериальной инфекции у детей раннего возраста.

**Материалы и методы.** Под нашим наблюдением находилось 156 пациентов с моноинфекцией и 105 пациентов со смешанной ротавирусно-бактериальной инфекцией, 83 пациента с РВИ, развившейся на фоне сопутствующей соматической или другой инфекционной патологией (РВИ/СП) в возрасте от 2 месяцев до 3 лет, госпитализированных в Витебскую областную инфекционную клиническую больницу в период с 2010 по 2012 гг.

Диагноз МРВИ или РВИ/БИ устанавливался на основании клинико-лабораторных признаков кишечной инфекции с обязательным лабораторным подтверждением. Лабораторное подтверждение диагноза было основано на обнаружении антигена ротавируса в кале методом ИФА («Ротавирус-антиген-ИФА-Бест», ЗАО «Вектор-Бест», РФ) или ИХТ («VIKIA®Rota-Adeno», «bioMérieux», Франция), а также РНК ротавирусов группы А в кале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» и «АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ). Смешанные ротавирусно-бактериальные варианты инфекции лабораторно подтверждались выявлением ДНК *Campylobacter spp.* в кале методом ПЦР, а так же выделением сальмонелл, *S.aureus*, других представителей условно-патогенной флоры (УПФ) в посевах кала. Этиологическую роль УПФ в генезе смешанной ротавирусно-бактериальной инфекции устанавливали на основе массивности выделения в острый период заболевания (титр $10^5$ КОЕ/г и более) при отсутствии бактериологического

и молекулярно-генетического подтверждения, свидетельствующего в пользу ОКИ, вызванных патогенной флорой, а также наличие диагностически значимых титров аутоантител к выделенным штаммам УПФ.

Диагноз ротавирусной суперинфекции РВИ/СП устанавливался при появлении симптомов поражения ЖКТ в срок не ранее, чем через 48 ч от момента госпитализации в соматическое/инфекционное отделение, или не позже 72 ч после выписки из стационара.

Чувствительность к антибиотикам выделенных 75 клинических изолятов *Salmonella spp.*, 79 изолятов *S.aureus* и 92 клинических изолятов условно-патогенной флоры (*P.mirabilis, P.vulgaris, K.pneumoniae, E.coli, Citrobacter spp., Enterobacter spp., Ps.aeruginosae*) определяли диско-диффузионным методом с использованием дисков с антибиотиками, диагностических наборов ATB STAPH5 (Becton Dickinson,США; «bioMérieux», Франция) .

Результаты исследований, обрабатывались статистическим методом с использованием программы Microsoft Excel, Statistika 6.

**Результаты и их обсуждение.** Клиническая эффективность использования антибиотиков в лечения пациентов с МРВИ была оценена при рандомизированном назначении одной из двух схем терапии при поступлении в стационар: только базисная патогенетическая терапия, включающая диетическое низколактозное питание, оральную или парентеральную регидратацию и энтеросорбент (группа I); базисная патогенетическая терапия в сочетании с антибактериальным препаратом (группа II). В качестве антибактериальной терапии использовались препараты, рекомендованные для лечения ОКИ у детей — азитромицин, налидиксовая кислота, нифуроксазид, цефотаксим, цефтриаксон. Все пациенты на догоспитальном этапе антибиотик не получали.

Пациенты, у которых диагноз РВИ в последующем не подтверждался лабораторно, исключались из групп сравнения. В результате были сформированы 2 группы: группа I включала 105 пациентов, группа II — 51 пациента.

Как показал проведенный анализ, введение в схему терапии пациентов с РВИ антибактериального препарата не приводило к более быстрой динамике купирования основных клинических симптомов. Средняя длительность лихорадки при назначении антибактериальной терапии составила 2,20 дня (95% ДИ: 1,89…2,52), в то время как у пациентов, получающих только патогенетическую терапию 2,13 дня (95% ДИ: 1,92…2,35). Продолжительность дисфункции со стороны желудочно-кишечного тракта (рвота и диарейный синдром) в группе II не только не сокращалась, но и имела тенденцию к более позднему купированию. Так, средняя длительность диареи у детей, получавших только патогенетическую терапию, составила 3,34 дня (95% ДИ: 3,09…3,59), в то время как у пациентов II группы– 3,88 дня (95% ДИ: 3,46…4,30). Рвота купировалась в течение 1,47 (95% ДИ: 1,3…1,65), и 1,93 дней (95% ДИ: 1,58…2,27) соответственно, что, в свою очередь, могло привести к удлинению продолжительности инфузионной терапии (3,09 дня (95% ДИ: 2,75…3,45) vs 2,61 дня (95% ДИ: 2,43–2,81).

Среди наблюдавшихся нами пациентов у 37,86±2,9% детей с ротавирусной инфекцией в бактериологических посевах кала был выделен один и более бактериальных агентов. Наиболее часто РВИ/БИ протекала в сочетании с условно-патогенной флорой, в том числе *S.aureus* — 64,15±4,68% пациентов. У 12,26±3,2% детей РВИ сочеталась с другими представителями условно-патогенной флоры: *P.mirabilis, P.vulgaris, K.pneumoniae, Citrobacter spp., Enterobacter spp., P.aeruginosae*. У 8,49±2,72% пациентов был выделен *Campylobacter spp.*, у 15,09±3,49% — *S. enteritidis/typhimurim*.

Проведенный нами анализ позволил установить, что наличие микст-инфекции в значительной мере меняет классическую клиническую картину заболевания, свойственную каждой из составляющих, затрудняя клиническую диагностику и тактику терапии. Так, РВИ/БИ достоверно чаще ($p<0,001$) протекала в энтероколитической и гастроэнтероколитической формах, которые регистрировались у 61,32±4,75% детей при микст инфекции и у 25,8±3,33% при моно инфекции. При РВИ/БИ достоверно чаще ($p<0,001$), чем при моноинфекции в стуле наблюдались патологические примеси —— непереваренные остатки пищи, хлопья, слизь, зелень (79,25±3,99 vs 36,7±3,72%). У 11,32±3,09% детей регистрировался гемоколит, который отсутствовал при моно инфекции. Причем в 55,66±4,85% случаев отмечались копрологические изменения, отражающие наличие инвазивной диареи и воспалительного процесса в толстом кишечнике, что было более характерным для детей первого года жизни.

Оценка клинической эффективности патогенетической терапии была проведена у 65 детей с инвазивными формами РВИ/БИ, протекающими без гемоколита. Как показал анализ, на фоне базисной патогенетической терапии диарея купировалась самостоятельно у 64,52±8,74% пациентов первого года жизни, и у 73,53±7,68% детей в возрасте от 1 до 3 лет. Дополнительно у пациентов с РВИ/БИ нами оценена клиническая эффективность пробиотиков. Все пациенты с клиникой водянистой диареи, протекающей с признаками колита, при поступлении в стационар получали одну из схем терапии: базисная патогенетическая терапия (III группа) или базисная патогенетическая терапия + пробиотик (IV группа).

В результате пациенты были разделены на 2 группы: III группа включала 19 пациентов, IV группа — 21 пациента. Как показал анализ, включение в схему патогенетической терапии пробиотика не способствовало более быстрой динамике купирования основных клинических симптомов. Не отмечалось достоверных различий в динамике исчезновения лихорадки, в двух сравниваемых группах нормализация температуры тела происходила в течение 2–3 дней, диарея купировалась на 3–4 день болезни. Длительность диареи у пациентов, получающих только базисную патогенетическую терапию составила в среднем 3,79 дня (95% ДИ: 2,95…4,63), а у пациентов, получающих наряду с регидратацией и энтеросорбентом пробиотик, — 3,95 дня (95% ДИ: 3,33…4,57). Также не наблюдалось достоверных различий в сроках исчезновения патологических примесей в стуле (1,90 дня (95% ДИ: 1,19…2,61) vs 2,09 дня (95% ДИ: 1,62…2,56) и сроках нормализации стула (4,79дня (95% ДИ: 4,01…5,57) vs 5,05 дня (95% ДИ: 4,37…5,73) в III и IV группах соответственно).

Наличие признаков инвазивной диареи, в первую очередь гемоколита, является показанием для назначения антибактериальной терапии, выбор которой может определяться этиологической структурой бактериальных возбудителей. Как показали результаты проведенных нами исследований, этиологическая структура микст ротавирусно-бактериальной инфекции, протекающей с явлениями гемоколита, у детей первого года жизни включает *S.aureus* (42,86±8,49%), других представителей условно-патогенной флоры (8,57±4,80%), *Salmonella spp.* (34,29±8,14%), *Campylobacter spp.* (14,29±6,0%). В то же время, у пациентов этой возрастной группы, с инвазивными формами РВИ/БИ, протекающей без гемоколита, в 70,37±6,27% случаев в кале обнаруживался *S.aureus*, в 11,11±4,32% другие представители условно-патогенной флоры. Патогенная флора (*Salmonella spp., Campylobacter spp.*) выделялась достоверно реже (18,52±5,34% пациентов, $p<0,0001$). У детей старше года при смешанной РВИ/БИ, протекающей со слизью в стуле и признаками воспалительных изменений в копрограмме при отсутствии гемоколита, в посевах кала в равной степени выделялась условно-патогенная и патогенная флора. Условно-патогенная флора была обнаружена у 15,38±5,05% пациентов, *S.aureus* был выделен в 42,31±6,92% случаев, *Salmonella spp.* — в 26,92±6,21%, *Campylobacter spp.* — в 15,38±5,05% случаев. При РВИ/БИ, протекающей с гемоколитом в этой возрастной группе в 87,1±6,12% случаев причинным фактором являлись представители патогенной флоры (*Salmonella spp, Campylobacter spp.*). Основную группу из всех выделенных сальмонелл составила *S.enteritidis* (68,6%), в 17,6% случаев была обнаружена *S.typhimurium*, в 11,8% — сальмонеллы редких сероваров (*S.brandenburg, S.muenchen, S.stanlei*).

Анализ этиологической структуры ротавирусной суперинфекции (РВИ/СП), протекающей с признаками инвазивной диареи, показал, что у 81,82±8,42% пациентов, у которых РВИ/СП развилась на фоне другой кишечной инфекции, из кала продолжала выделяться флора, являющаяся причиной первичной госпитализации пациента в кишечное отделение. В случае же смешанной РВИ/СП, протекающей на фоне другой сопутствующей патологии, причинными бактериальными этиологическими агентами диареи в 100,0% явились представители условно-патогенной флоры (в 41,67±14,8% *S.aureus*, в 58,33±14,8% — другая условно-патогенная флора — *P.mirabilis, P.vulgaris, K.pneumoniae, E.coli, Citrobacter spp., Enterobacter spp., Ps.aeruginosae*).

При определении чувствительности к антибиотикам выделенных из кала пациентов с РВИ/БИ сальмонелл было установлено, что ни к одному из исследуемых антибактериальных препаратов сальмонеллы не проявляют 100% чувствительности. При этом максимальные уровни чувствительности были установлены к цефалоспоринам IV поколения (96,00±2,28%), карбапенемам (98,67±1,33%), ципрофлоксацину (98,67±1,33%), азитромицину (96,00±2,28%). Чувствительность к цефалоспоринам III поколения (89,33±3,59%), амикацину (90,67±3,38%), налидиксовой кислоте (72,00±5,22%), хлорамфениколу (81,33±4,53%), нитрофурантоину (89,33±3,59%) была несколько ниже. Наименее чувствительными сальмонеллы оказались к тетрациклину (38,67±5,66%) и ко-тримоксазолу (50,67±5,81%).

При определении чувствительности к антибиотикам клинических изолятов *S.aureus*, было также установлено, что ни к одной группе из исследуемых антибактериальных препаратов он не проявляет стопроцентную чувствительность. Наиболее активными в отношении золотистого стафилококка оказались препараты из группы фторхинолонов, нитрофурантоин, азитромицин, чувствительными к которым оказались 83,54–92,41%, 82,28 и 85,96% исследуемых изолятов соответственно. Обращает на себя внимание большой удельный вес MRSA среди выделенных штаммов *S.aureus*, который в зависимости от возраста детей составляет от 43,75±8,91% до 75,76±7,58%. Также невысокую чувствительность *S.aureus* проявлял к гентамицину (30,38±5,21%), клиндамицину (43,04±5,61%), тетрациклину (50,63±5,66%), рифампицину (62,03±5,50%), налидиксовой кислоте (59,49±5,56%). Однако обращают на себя внимание достаточно высокие уровни чувствительности *S.aureus* к котримоксазолу (77,22±4,75%). При исследовании условно-патогенной флоры была обнаружена ее высокая чувствительность к цефалоспоринам III поколения (95,62±2,1%), карбапенемам (98,91±1,09%), ципрофлоксацину (91,3±2,9%), азитромицину (86,96±3,5%), амикацину (95,65±2,1%).

Таким образом, с учетом полученных результатов, нами были разработаны алгоритмы терапии смешанной ротавирусно-бактериальной инфекции. При наличии клиники водянистой диареи у детей оптимальным является назначение базисной антибактериальной терапии, включающей диету и энтеросорбенты. При наличии у пациента клиники водянистой диареи с вовлечением в процесс толстого кишечника, основополагающую роль в назначении терапии играют условия возникновения заболевания. Так, при возникновении заболевания в домашних условиях и отсутствии явлений гемоколита назначение антибактериальной терапии в большинстве случаев не показано и может быть ограничено только пациентами, у которых имеется отсутствие эффекта патогенетической терапии в течение 48 ч. Выбор антибиотика в этом случае может определяться с учетом выделенной бактериальной флоры, а при ее отсутствии возрастом пациента и наиболее вероятным возбудителем, которым является *S.aureus* у детей первого года жизни, и у пациентов старше 1 года. Таким образом, препаратом выбора у пациентов первого года жизни в данной клинической ситуации при отсутствии эффекта от проводимой патогенетической терапии может являться нифуроксазид, а при утяжелении состоянии на фоне проводимой патогенетической терапии – налидиксовая кислота. У пациентов старше года в данной клинической ситуации в качестве стартовой антибактериальной терапии препаратом выбора также может служить налидиксовая кислота. Препаратом резерва в таких случаях для всех возрастных групп могут быть азитромицин и цефалоспорины 3-го поколения, а для детей первого года жизни так же и налидиксовая кислота.

При наличии клиники водянистой диареи, сочетающейся с поражением толстого кишечника и протекающей с гемоколитом, возникающей в домашних условиях у пациентов старше года выбор антибактериальной терапии определяется активностью в отношении сальмонеллы и кампилобактера, а у детей первого года жизни — и в отношении золотистого стафилококка. В качестве стартовой антибактериальной терапии в данной клинической ситуации терапией выбора у детей первого года жизни является комбинированная терапия цефалоспорины 3-го поколения + нифуроксазид, а у детей старше года цефалоспорины 3-го поколения ± азитромицин в зависимости от тяжести течения заболевания. Терапией резерва для всех возрастных групп может служить налидиксовая кислота.

При возникновении ротавирусной инфекции в условиях стационара выбор антибактериальной терапии при наличий показаний к ее назначению определяется бактериальным возбудителем предшествующей ОКИ. При наслоении ротавирусной инфекции на ОРИ выбор антибиотика должен определяться чувствительностью условно-патогенной флоры. Препаратами выбора в этом случае являются цефалоспорины 3-го поколения, препаратом резерва — азитромицин.

**Выводы:**

1. Включение в схемы патогенетической терапии РВИ пробиотиков существенно не влияет на сроки лечения, но увеличивает экономические затраты.

2. Наличие в стуле детей, больных ротавирусной инфекцией, слизи при отсутствии изменений в копрограмме не является показанием для назначения антибактериальной терапии.

3. Показанием для назначения антибактериальной терапии у пациентов со смешанной ротавирусно-бактериальной инфекцией, протекающей с вовлечением в процесс толстого кишечника, является наличие явлений гемоколита, а при его отсутствии — неэффективность патогенетической терапии в течение 48 ч.

4. Этиологическая структура бактериальных патогенов при смешанной ротавирусной инфекции имеет существенные различия в зависимости от возраста пациента, условий возникновения заболевания, особенностей клинических проявлений, что наряду с чувствительностью к антибиотикам, является определяющим в выборе антибактериальной терапии.

**Литература**

1. Покровский, В.И. Инфекционные болезни в конце XX века и санитарно-эпидемиологическое состояние в XXI веке / В.И. Покровский, Г.Г.Онищенко, Б.А.Черкасский // Журн. микробиологии. — 2002. — № 3. — С. 6–8.
2. Гончар, Н.В. Факторы риска развития острых кишечных инфекций и состояние неспецифической резистентности у новорожденных детей / Н.В. Гончар, Л.В. Березина // Сб. материалов I Междисципл. конф. по акушерству, перинаталогии, неонаталогии «Здоровая женщина — здоровый новорожденный». — СПб., 2006. — С. 42–44.
3. Горелов, А.В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых кишечных инфекций у детей: пособие для врачей / А. В. Горелов, Л. Н. Милютина, Д. В. Усенко. — М.: Медицина, 2006.
4. . Roman, E. Detection of rotavirus in stool samples of gastroenteritis patients / E. Roman, I. Martinez // PR Health Sci. J. — 2005. — Vol. 24, № 3. — P. 179–184.
5. Wilhelmi, I. Viruses causing gastroenteritis / I. Wilhelmi, E. Roman, A. Sanchez-Fauquier // Clin. Microbiol. Infect. — 2003. — Vol. 9. — P. 247–262.
6. Незгода, И.И. Ротавирусная инфекция у детей: современные подходы к лечению / И.И. Незгода, О.В. Боднарюк // Новости медицины и фармации. — 2007. — № 2. — С. 2–3.
7. Буланова, И.А. Ротавирусная инфекция в условиях крайнего севера / И.А. Буланова [и др.] // Экология человека. — 2007. — № 3. — С. 24–27.

## ANTIBACTERIAL THERAPY AT THE INFECTIONS MIXED BY ROTAVIRUSNO-BAKTERIALNYH AT CHILDREN

**Lyakhouskaya N.V. , Dmitrachenko T.I., Semenov V.M., Krylova E.V.**

*Vitebsk State Medical University, Vitrbsk, Belarus*

We've gave the recommendations on the pathogenetic therapy of rotaviral infection; we've also proposed the schemes of antibacterial therapy of rotaviral infection accompanied by the signs of invasive diarrhoea caused by joining of bacterial agents, taking into account their origin and the predetermined level of their resistance to antibacterials, as well as the age of the patient and the data of one's past history.

**Keywords:** rotaviral infection, mixed rotaviral and bacterial infection.

Поступила 06.09.2013

## EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF HUMAN GUT MICROBIOTA PATHOGENS

**Melik-Andreasyan G.G.[1],Tkhruni F.N.[2], Tsakanyan A.V.[1], Karapetyan K.J.[2], Khanjyan G.J.[1], Khachatryan T.V.[2]**

*[1]The Research Institute of Epidemiology, Virology andMedical Parasitology of Ministry of Health;*

*[2]Laboratory of Microbial Preparations, Scientific and Production Center "Armbiotechnology", NAS, Yerevan, Republic of Armenia*

The prevalence and diversity of multidrug-resistance (MDR) of pathogenic strains, isolated from infected patients, were examined. It was shown, that studied strains showed high sensitivity to fluoroquinolones — 82, 6 and 81.8% respectively to ofloxacin and ciprofloxacin. High resistance strains showed to an beta-lactams (47.8–100%). It was approved, that 91.3% of pathogens are multi-resistant to the action of antibiotics from 2 to 9.

The biologically active peptides (bacteriocins BCN) were isolated from cultural broth of Lactobacillus rhamnosus BTK-109 strain and partially purified. The comparative inhibitory activity of these peptides against antibiotic resistant pathogens was investigated. The results of the investigation allow confirming that obtained peptides can be used as alternative agents to antibiotics for the prevention or treatment of infectious diseases.

**Keywords:** multidrug-resistance, gut microbiota pathogens,bacteriocin.

**Introduction.** Resistance to antibiotics are an increasing, global problem for public health. In the WHO European Region, the resistance of some pathogens now reaches over 50% in some countries. It is revealed that 34.1% of staphylococci studied in the Republic of Armenia, are resistant to oxacillin. Selective pressure exerted by the use of antimicrobials in both human and animal populations over the past several decades has led to the emergence of multidrug-resistant (MDR) bacterial populations that are resistant to many commercially available drugs and new resistant mechanism are emerging and spreading rapidly. This is an increasing threat to both human and animal health. Attention has been focused on mobile genetic elements such as plasmids that carry multiple resistance genes, because the horizontal transfer of plasmids allows the rapid dissemination of MDR to susceptible populations [1].

High percentage of hospital-acquired infections are caused by highly resistant bacteria such as methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and vancomycin or multidrug-resistant Enterococci Gram-negative bacteria. Food borne pathogenic bacteria can also carry multiple antimicrobial resistance plasmids [2]. Acquired resistance to first-line antimicrobial agents increasingly complicates the management of extra-intestinal infections due to Escherichia coli, which are a major source of illness, death, and increased healthcare costs [3]. Salmonellae are important food-borne pathogens noted for causing millions of cases of food-borne illness in the United States each year. Nontyphoidal salmonellosis is generally a self-limiting disease, and patients frequently recover without the need for medical attention. However, a small percentage of Salmonella infections result in invasive salmonellosis, a more severe form of illness requiring hospitalization and antibiotic therapy [4].

Thus, the continue development of new classes of natural antimicrobial agents has become of increasing importance for medicine [5]. Bacteriocins, produced by probiotic strains of lactic acid bacteria, are an interesting group of biomolecules with antimicrobial properties that may represent a good alternative. Bacteriocins were found to be safe for human consumption by the Food and Drug Administration. They differ from most therapeutic antibiotics in being proteinaceous agents that are rapidly digested by proteases in the human digestive tract.

The **aim** of this study was investigation of inhibitory activity of biologically active peptides isolated from cultural broth of Lactobacillus rhamnosus BTK-109 strain against multidrug-resistant human gut microbiota pathogens.

**Materials and Methods.** Microbial strain and growth media. Lactic acid bacteria strain LrhamnosusBTK-109 was used. Strain deposited with the Department of Center of Microbial Depository (CMD) of SPC "Armbiotechnology" NAS RA under the number № 9614. The strain Lrhamnosus BTK-109 № 9614 was grown in MRS agar and broth (MERK, Germany,) and stored as frozen stock at -20°C in the MRS broth containing 40% Glycerol (v/v). Before experimental use, the culture was propagated twice into the appropriate medium and incubated during 48 hours in temperature controlled conditions in thermostat at 37°C.

Test cultures growth. Gut microbiota pathogenic bacteria, such as G-negative *Salmonella enteritidis, S.typhimurium, Salmonella sp. Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae,Proteus mirabilis, Esherichia coli* and G-positive *Staphylococcus epidermidis, Staph. aureus*, were isolated from infected patients in the "Nork" Infection Hospital (Yerevan, RA). Isolated bacteria stored in the microorganism depository of The Research Institute of Epidemiology, Virology and Medical Parasitology of Ministry of Health, Armenia (IEVP).

The following bacteria from the Department of Center of Microbial Depository (CMD) of SPC "Armbiotechnology" NAS RA were used: *E.coli, Ps.fluorescens, Ps.aerugines, L. monocytogenes, S.enteritica*.

Bacteria were grown in Nutrient agar (Himedia, India) at pH 7.2 for 16 h and at 37°C, then harvested and suspended in the Nutrient broth till $2.2\times10^6$ CFU/ml.

Determination of resistance to antibiotics. To determine resistance of isolated human gut microbiota pathogens to antibiotics, the method with antibiotic disks was applied [6]. Each strain was inoculated into appropriate broth, incubated at 37ºC for 16 h. By spread plate technique the cultures were inoculated in the plates using sterile swab. The antibiotic discs of Amikacin 30 µg, Ofloxacin 5 µg, Ceftazidime 30 µg, Doxycyclin 10 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Gentamicin 120 µg, Cefalotin 30 µg,Cefazolin 30 µg, Azithromicin 15 µg, Cefuroxime 30 µg. (Oxoid, UK) were placed in the plates. Agar plates with antibiotic disks were then incubated at 37ºC for 24 h.

Determination of antimicrobial activity. The spot-on-lawn method on the test culture inoculated in the solid medium was applied. Suspension of the test culture in the Nutrient broth (containing $10^6$ CFU/ml) spread across the surface and aliquots of investigated samples of 20µl were applied above the test culture

using micropipette. Plates were incubated in temperature-controlled conditions at 30°C during 24–48 h. Antimicrobial activity was assessed by measuring the size of the inhibition zone (diameter) of test culture growth (Ø, mm) after 24 h incubation in thermostat at 30°C. The antimicrobial activity is expressed in arbitrary units (AU/ml) [7]. For calibration of antimicrobial activity, the test culture *S.typhimurium* was used.

Purification of CFC broth of LAB by ion-exchange chromatography. *Lrhamnosus* BTK-109 culture was grown in 1000 ml of MRS broth and incubated overnight at 37°C for 24 h. At the end of culture growth cells were harvested by centrifugation at 10,000 g during 20 min. Cell free culture broth was purified by ion-exchange chromatography and gel filtration [8]. Statistical analysis of experimental dada carried out by Styudent's test program in Microsoft Exel–2000.

**Results.** The antibiotic resistance of pathogenic strains of human gut microbiota to 10 antibiotics (aminoglycosides, beta-lactams, fluoroquinolones), widely used in medicine in Armenia was investigated. Summary data are shown in table 1.

Table 1 — Antibiotic resistance of pathogenic bacteria of gut micribiota

| № | Bacterialstrains | Antibiotics | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Amicacin | Ofloxacin | Ceftazidime | Doxycyclin | Ciprofloxacin | Gentamicin | Cefalotin | Cefazolin | Azithromicin | Cefuroxime | Sensitivity, % |
| 1 | *S.enteritidis*47 | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | 30.0 |
| 2 | *S. enteritidis* 48 | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | 30.0 |
| 3 | *S. enteritidis* 49 | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - | 30.0 |
| 4 | *S.typhimurium*50 | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | 40.0 |
| 5 | *S.typhimurium*51 | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | 30.0 |
| 6 | *Salmonella* sp. 52 | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | 30.0 |
| 7 | *Salmonella* sp. 53 | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | 30.0 |
| 8 | *S.typhimurium*59 | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | 30.0 |
| 9 | *Staph.aureus* 21 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 90.0 |
| 10 | *Staph.aureus* 13 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | 80.0 |
| 11 | *Staph.aureus* 67 | - | - | ND | + | - | + | - | + | + | + | 55.5 |
| 12 | *Staph. epidermidis 66* | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 90.0 |
| 13 | *Ps.aeruginosa*12 | + | - | + | - | + | + | - | - | - | - | 40.0 |
| 14 | *Ps.aeruginosa*10e | + | + | + | - | + | ND | ND | - | + | - | 62.5 |
| 15 | *Ps.aeruginosa68* | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | 30.0 |
| 16 | *Klebsiella pneumoniae*B | + | + | + | - | - | ND | ND | - | - | + | 50.0 |
| 17 | *E.coli* 10 | + | + | + | - | + | ND | ND | - | + | + | 75.0 |
| 18 | *E.coli* 1 | - | + | + | - | + | ND | ND | + | - | + | 62.5 |
| 19 | *E.coli*18 | + | + | - | + | ND | ND | ND | + | + | + | 85.7 |
| 20 | *E.coli* 4 | + | + | + | + | + | ND | ND | + | + | + | 100.0 |
| 21 | *Pr. mirabilis22* | - | + | + | - | + | + | - | + | - | + | 60.0 |
| 22 | *Pr. mirabilis*21 | - | + | + | - | + | - | - | - | ND | - | 33.3 |
| 23 | *Pr.mirabilis* 59э | + | - | + | - | - | ND | ND | + | - | + | 50.0 |

Legend: 1. "–" — resistance; "+" — sensitivity; ND — not determined.

The results show that studied strains showed high sensitivity to fluoroquinolones — 82, 6 and 81.8% respectively to ofloxacin and ciprofloxacin. Studied strains were highly resistant to a beta-lactams (81.3; 77.8; 56.5; 50.0; 47.8% correspondingly to cefalotin, cefazolin, ceftazidime, cefuroxime. Microorganisms reveals high resistance to doxycyclin — 78.3%, less to aminoglycosides — 59.1% for azithromicin and 52.2% to amikacin respectively. Exception from this group is gentamicin to which was susceptible 80% of the studied strains. Resistance to across almost all examined pathogenic bacteria and mostly depends from generic and specific supplies of strains. *Staph.aureus* and *E.coli* possesses high sensitivity to investigated antibiotics, while strain of Salmonella genus shown high resistance to antibiotics.

Lactic acid bacteria strain Lrhamnosus BTK-109 was isolated from salted cheese from rural household of Armenia. Previously we have shown that the strain Lrhamnosus BTK-109have probiotic properties and a broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative organisms [9]. Partially purified antimicrobial preparation of *L.rhamnosus* 109 was re-purified by HPLC method. Results of purification showed that preparation contain 2 active bacteriocins (BCN). Results of chromatograms and spectrograms indicate that these BCNs have peptide bonds. Spectrograms demonstrate that molecular weight of BCN 1 and BCN 2 (of peptide nature) are and 1.427 Da, 602.6 Da respectively.

The growth inhibition of various bacteria of Salmonella genus serotypes caused by the preparation was investigated.The results are presented in table 2.

Table 2 — Bactericidal activity of antimicrobial preparation against bacteria of *Salmonella* genus serotypes

| Sources of bacteria | Bacteria | Antimicrobialpreparation (AUml$^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 2,800 | 1,400 | 700 |
| Antibiotic resistant pathogens (IEVP) | | Growth inhibition zones,Ømm | | |
| | *Staph. aureus* 21 | 15±2 | 7±0.8 | none |
| | *Staph. aureus sp.* 13 | 13±1 | 15±2 | none |
| | *Ps. aeruginosa* 12 | 14±1 | 11±2 | none |
| | *Ps. aeruginosa 10э* | 14±1 | 11±2 | none |
| | *Klebsiellapneumoniae B* | 14±1 | 9±1 | none |
| | *Proteusmirabilissp.59э* | 13±0.9 | 9±1 | none |
| | *Proteus mirabilis 21* | 12±1 | 10±0.7 | none |
| | *Proteusmirabilis22* | 12±2 | 10±0.7 | none |
| | *E.coli*10 | 14±2.2 | 8±0.8 | none |
| | *E.coli*1 | 14±2.2 | 8±0.8 | none |
| | *E.coli*4 | 14±2.2 | 9±1 | none |
| | *E.coli*18 | 14±2.2 | 10±1 | none |
| Pathogens (“Armbiotechnology”) | *L.monocytogenes*1 | 18±3 | 14±1 | none |
| | *L.monocytogenes*2 | 10±0.9 | 14±1 | none |
| | *L.monocytogenes*1691 | 10±0.9 | 12±0.9 | none |
| | *Ps.fluorescens*INMIA 9068 | 8±0.6 | 7±0.5 | none |
| | *Ps. aerugines* INMIA 9056 | 18±2 | 12±1 | none |
| | *E.coli*K12 | none | none | none |
| | *E.coli* ATCC 11303 | none | none | none |
| | *E.coli*1-12 | none | none | none |

Legend: none — absence of growth inhibition.

As can be seen from the results in table 2, antimicrobial preparation differently inhibit the growth of pathogenic bacteria of the *Salmonella* genus. It has practically inhibited the growth of all antibiotic-resistant bacteria examined at 1,400 Au/ml concentration, leading to formation of lysis zones, and inhibited poorly (or not at all) at a concentration of 700 AU/ml. The pathogenic bacteria growth inhibited with less efficiency. This difference can be explained by the serotype diversity of the used strains.

The comparative bactericidal activity of antimicrobial preparation against antibiotic resistant pathogens, pathogenic and none pathogenic bacteria shown in table 3. As can be seen from the table, inhibition of the growth of pathogenic bacteria of various genera varied and depends from concentrations of antimicrobial preparation. Growth of *Ps.aeruginosa 10e* and *Klebsiellapneumoniae B* strains was observed in the form of lysis at aconcentration of cationic substance 2 of 2.800 and 1.400 AU/ml, while *Pr. mirabilis* didnot form lysis zones. Zones of lysis show that the antimicrobial preparation inhibited the growth of *L.monocytogenes* 1691.

As it follows from the results presented in the table 3, the efficacy of the preparation to inhibit the growth of different *E. coli* are low. From 7 *E. coli* strains inhibited only 4 strains. The bactericidal efficacy toward *E. coli* cultures positively depended on the activity of antimicrobial preparation. Possibly, further increase of concentrations in spot method would result in expanding the selectivity toward different *E. coli* strains. However, results demonstrated higher bactericidal efficacy of the antimicrobial preparation toward Salmonella strains as compared to *E. coli* strains.

**Discussion.** As can be seen from our results, gut microbiota pathogenic bacteria were the most resistant to various antibiotics. One of them showed 72% of stability, the other 92%.

It was shown that the partially purified antimicrobial preparation from *L.rhamnosus* 109 inhibited the growth of some antibiotic-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria with different efficiency. The inhibition effect depended on concentration of the cationic substance and genus of the examined bacteria of gut microbiota. The diverse efficiency of growth inhibition may probably relate to the different mechanisms of action of the substances towards bacteria cell membrane. This is confirmed by the fact that these antimicrobial preparation have both bacteriostatic and bactericidal properties. Our results showed that antibiotic resistant pathogenic bacteria of gut microbiota are more sensitive to preparation, than other pathogenic bacteria. The resistance of gram-negative bacteria is attributed to the particular nature of their cell membrane; the mechanism of action described for bacteriocin involved a phenomenon of adsorption of bacteriocins on the cell wall. It should be noted that the differences in the sensitivity of *Listeria, Clostridium, Propionibacterium, Enterococcus sp., oral Streptococcus sp.* to the action of lactic acid bacteria, described by other authors [10]. Above all, they explain it with the presence of specific receptor proteins required for binding to bacteriocinsand their transport into the bacteria.

Table 3 — The effect of antimicrobial preparation against gut microbiota pathogens

| Sources of bacteria | Bacteria | Antimicrobialpreparation (AU ml$^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 2,800 | 1,400 | 700 |
| | | Growth inhibition zone, Ø, mm | | |
| Antibiotic resistant pathogens (IEVP) | *S.enteritidis 47* | 8±0.8 | 8±0.5 | 5±0.4 |
| | *S.enteritidis 48* | 14±1.0 | 8±0.5 | 5±0.5 |
| | *S.enteritidis 49* | 10±0.5 | 8±0.5 | 7±1.0 |
| | *S.typhimurium 50* | 9±0.5 | 6±1.0 | 4±1.1 |
| | *S.typhimurium51* | 12±1.0 | 9±0.8 | 7±1.2 |
| | *Salmonella sp. 52* | 12±1.0 | 12±1.0 | 6±0.5 |
| | *Salmonella sp.53* | 12±1.0 | 10±0.6 | 6±0.5 |
| Pathogens (“Armbiotechnology”) | *S.enteritica*5091 | 10±0.5 | 10±0.6 | 6±0.3 |
| | *S.enteritica*14848 | 14±1.2 | 6±0.3 | 4±0.2 |
| | *S.enteritica*9379 | none | none | none |
| | *S.enteritidis*34/34 | 14±1.5 | 10±1.0 | none |
| | *S.enteritidis*1 | none | none | none |
| | *S.enteritidis*443 | none | none | none |
| | *S.typhimurium* 256 | none | none | none |
| | *S.typhimurium* 100 | 14±1.0 | 9 ±0.8 | none |
| | *S.typhimurium* Q | 12±0.9 | 9±0.8 | none |

Legend: none — absence of growth inhibition.

This work was realized with financial support of the Project Global Initiatives for Preliferation Prevention (GIPP)T2–298 (2010–2013).

**References**

1. Barlow, M. What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer / M. Barlow // In: Horizontal Gene Transfer / M.B. Gogarten, J.P. Gogarten, L. Olendzenski (eds.). — NY: HumanaPress. 2009. — P. 397–411.

2. Antimicrobialresistance-conferring plasmids with similarity to virulenceplasmids from avian pathogenic Escherichia coli strains inSalmonella enterica Serovar Kentucky isolates from poultry / W.F. Fricke [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — Vol. 75. — P. 5963–5971.

3. Russo, T.A. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: an overlooked epidemic / T.A. Russo, J.R. Johnson // Microbes Infect. — 2003. — Vol. 5. — P. 449–456.

4. Multiple antibiotic resistance gene recruitment onto the enterohemorrhagic Escherichia coli virulence plasmid / C. Venturini [et al.] // FASEB J. — 2010. — Vol. 24. — P. 1160–1166.

5. Fisher, J.F. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics:compelling opportunism, compelling opportunity / J.F. Fisher, S.O. Meroueh, S. Mobashery // Chem. Rev. — 2005. — Vol. 105. — P. 395–424.

6. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method / A.W. Bauer [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. — 1966. — Vol. 45. — P. 493–496.

7. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity / E. Parente [et al.] // J. Microbiol. Methods. — 1995. — Vol. 22. — P. 95–108.

8. Patent RA № 1723 A2 / A.E. Aghajanyan, F. Tkhruni. — 2006.

9. Probiotic properties of endemic strains of lactic acid bacteria / F.N. Tkhruni [et al.] // J. BioSci. Biotech. — 2013. — Vol. 2, № 2. — P. 109–115.

10. Vuist, L. The sourdough microfl ora: biodiversity and metabolic interactions / L. Vuist, P. Neysens // Trends in Food Sci. Technol. — 2005. — Vol. 16, № 1–3. — P. 43–56.

## ОЦЕНКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

**Мелик-Андреасян Г.Г.[1], Тхруни Ф.Н.[2], ЦаканянА.В.[1], Карапетян К.Дж.[2], Ханджян Г.Ж.[1], Хачатрян Т.В.[2]**

*[1]НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии Минздрава Республики Армения;*

*[2]Лаборатория Микробных Препаратов,НПЦ «Армбиотехнология» НАНГНКО,*

*Ереван, Республика Армения*

Были исследованы распространенность и разнообразие множественной лекарственной устойчивости патогенных штаммов, выделенных из инфицированных пациентов. Показано, что иссле-

дованные штаммы проявляют высокую чувствительность к фторхинолонам — 82, 6 и 81,8%, соответственно, кофлоксацину и ципрофлоксацину. Высокую устойчивостьштаммы проявляли кбета-лактамам (47,8–100%). Было доказано, что 91,3% исследуемых патогенныхмикроорганизмовобладают множественной лекарственной устойчивостьюк действию от 2 до 9 антибиотиков.

Из культуральной жидкости *Lactobacillus rhamnosus* BTK-109 выделены ичастично очищены биологически активные пептиды (бактериоцины BCN). Исследована антимикробная активность выделенных пептидов против антибиотикоустойчивых патогенных микроорганизмов. Результаты исследований позволяютпредположить о дальнейшемприменении полученных пептидов в качестве альтернативных средств вместоантибиотиков для профилактики или лечения инфекционных заболеваний.

Поступила 04.09.2013

## КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОТДЕЛЕНИИ ТОРАКАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ

**Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л., Бабаев С.Ю., Журавлев Р.В.**

*Пензенский государственный университет, Медицинский институт, г. Пенза, Российская Федерация*

**Резюме.** Внутрибольничные инфекции одна из серьезнейших проблем в эпидемиологии.

В статье представлены результаты анализа особенностей структуры, степени чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, клинико-эпидемиологических особенностей внутрибольничных инфекций у хирургических пациентов и факторы риска их развития в отделении торакальной хирургии многопрофильного лечебно-профилактического учреждения (ЛПУ).

**Ключевые слова:** нозокомиальные инфекции, торакальная хирургия, антибиотикорезистентность.

**Введение.** Стремительное развитие новых технологий в хирургии открыло широкие горизонты для выполнения сложных оперативных вмешательств. При этом сократилась продолжительность операций, снизилась травматичность и стали уходить в прошлое широкие оперативные доступы. Однако инфекции области хирургического вмешательства (ИОХВ), составляющие 15–25% всех нозокомиальных инфекций, остаются острой проблемой хирургии и на сегодняшний день [4].

ИОХВ способна свести на нет результаты любой, даже блестяще выполненной сложной операции. Согласно результатам эпидемиологических исследований, в структуре нозокомиальных инфекций частота послеоперационных гнойных осложнений составляет 24–38%. По экспертным оценкам, ежегодно в Российской Федерации эта патология наблюдается примерно у 700 тыс. пациентов [7].

В США, согласно отчету национальной системы по надзору за нозокомиальными инфекциями, в 2002 г. было зарегистрировано более 290 тыс. ИОХВ только у госпитализированных больных, причем развившаяся инфекция послужила причиной смерти в более чем 8 тыс. случаев [2].

Внутрибольничные инфекции представляют собой постоянную угрозу для здоровья госпитализированных больных и являются фактором значительного увеличения заболеваемости и смертности. Кроме того, они налагают экономическое бремя на больничный сектор в связи с длительной госпитализацией и увеличением расходов в здравоохранение [5]. Программы по контролю за нозокомиальными инфекциями, являются важными инструментами для предотвращения их распространения и уменьшения побочных эффектов, тем самым обеспечивая снижения риска возникновения ВБИ. Как широко описано в литературе стран с высоким уровнем дохода, в т. ч. США, заболеваемость нозокомиальными инфекциями может быть снижена на целых 30% и на 55% в случае послеоперационных, путем осуществления эффективного подхода к контролю за ними [6].

Согласно анализу за 2005–2010 гг., включающему 30 стран, частота встречаемости послеоперационных инфекций в торакальной хирургии составила 482 случая на 7880 операций (6,1%) [1].

В Пензенской области в 2012 г. зарегистрировано 678 случаев внутрибольничных инфекций. Показатель заболеваемости послеоперационными инфекциями в 2012 г. составил 3,99 на 1000 операций, что на 16,3 % выше, чем в 2011 г. (3,34 на 1000 операций) и на 5,9% выше, чем в 2010 г. (3,76 на 1000 операций) [3].

Изменяющиеся представления о раневом процессе, динамичное развитие хирургии постоянно предъявляют строгие требования к алгоритмам микробиологической диагностики и эффективного лечения ИОХВ. На микробиологических исследованиях базируется рациональная антибиотикотерапия, проведение которой невозможно без современных знаний этиологической значимости и уровня антибиотикорезистентности возбудителей хирургических раневых инфекций в данном регионе и конкретном стационаре.[7]

**Цель** работы: изучение эколого-эпидемиологических особенностей возбудителей нозокомиальных инфекций в отделении торакальной хирургии

**Материалы и методы.** Было проведено трехлетнее исследование случаев возникновения внутрибольничных инфекций в отделении торакальной хирургии многопрофильного стационара. Материалом исследования являлись мазки из трахеи, бронхов, ран, смывы с дренажа, плевральная жидкость, мокрота. Выделение, идентификацию, определение уровня антибиотикорезистентности микробных культур проводилось по общепринятым методикам в соответствии с официально утвержденными методическими указаниями. Для анализа ассоциаций выделенных микробных культур использовали коэффициент Жаккарда, являющийся наиболее достоверным показателем экологического сродства различных видов микроорганизмов.

Для характеристики частоты встречаемости мы подсчитали коэффициент ассоциативности, как критерий степени участия бактерий в микробных ассоциациях. Для сортировки и анализа полученных данных использовали программу WHONET 5.6

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенного исследования был выделен широкий спектр микроорганизмов (более 25) (рисунок 1). Преобладающими в микробиологическом пейзаже являлись грамотрицательные микроорганизмы, на их долю приходилось 51,75%. Грамположительных — 30,81%, грибы — 17,44%. Среди грамотрицательных преобладающими являлись: *Ps. aeruginosa* (22,67%), гр. (-) палочки (5,81%), *Acinetobacter spp.* (5,23%). Среди грамположительных наибольший удельный вес составил *S. viridans* (12,21%).

При изучении компонентного профиля инфекций в отделении торакальной хирургии было установлено, что 85,2% из них являлись моноинфекциями и 14,8% преимущественно двухкомпонентными полиинфекциями. Главным образом они были представлены ассоциациями *S. viridians*, *Ps. aeruginosa* и *Candida* с различными видами микроорганизмов.

Большинство видов микроорганизмов, выделенных от пациентов мониторинга, встречались преимущественно в виде монокультур, а не ассоциаций, т. е. их коэффициент ассоциативности был меньше 50%. Однако, грибы рода *Candida* и гр. (-) палочки встречались в большинстве случаев в ассоциациях и имели коэффициент ассоциативности 92,6% и 81,25% соответственно.

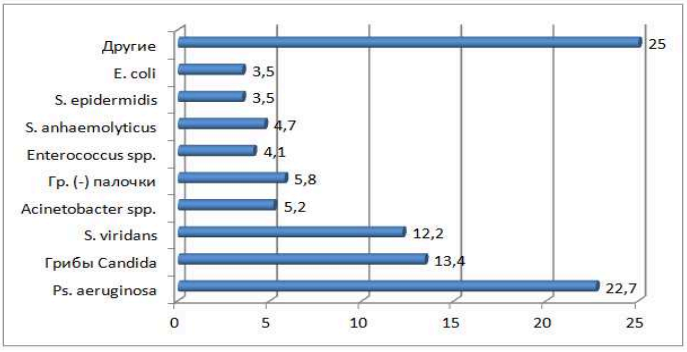



Рисунок — Этиологическая структура возбудителей нозокомиальных инфекций, %

При анализе коэффициента Жаккарда было установлено, что в ассоциациях между микроорганизмами существуют антагонистические взаимоотношения, следовательно, они неустойчивы и способны существовать короткое время.

При оценке антибиотикорезистентности микроорганизмов, встречающихся в отделении торакальной хирургии было установлено, что *Ps. aeruginosa* наиболее резистентна к нетромицину (72,1%), карбенициллину (76,84%), цефоперазону (65,25%), ципрофлоксацину (72,1%) и полимиксину (76,32%). Полученные штаммы были чувствительны имипенему, меропенему, цефепиму и цефтазидиму.

Среди гр. (-) палочек наблюдалась устойчивость к гентамицину (81,25%), карбенициллину (68,75%), цефоперазону (68,75%) и нетромицину (62,5%). Наибольшая чувствительность наблюдалась к ципрофлоксацину, цефепиму и имипенему. Для бактерий рода *Acinetobacter* характерно наличие штаммов резистентных к гентамицину (60%), карбенициллину (60%) и нетромицину (70%). Наиболее чувствительны штаммы к ципрофлоксацину, левомицетину и доксициклину.У *S. viridans* обнаружено наличие полирезистентных штаммов к оксациллину (83,33%), линкомицину (73,33%), клиндамицину (73,33%) и офлоксацину (70%). Наибольшая чувствительность наблюдается в отношении ванкомицина, фузидина, гентамицина и цефазолина.

В результате исследования установлены следующие клинико-эпидемиологические особенности нозокомиальных инфекций у пациентов отделения торакальной хирургии и факторы риска их развития. В демографической структуре ВБИ в отделении торакальной хирургии преобладают мужчины — 92,45%. В возрастной структуре пациентов достоверно преобладающей являлась старшая возрастная группа (40 лет и старше), а средний возраст пациентов составил 46 лет. В структуре гнойно-септических осложнений (ГСО) у пациентов отделения торакальной хирургии многопрофильного стационара преобладают: эмпиема плевры (29,81%), абсцесс легкого (28,3%), пневмония (22,64%), сепсис (3,77%) и флегмона (1,89%).

Основные виды оперативных и диагностических вмешательств, осложненных ВБИ: дренирование плевральных полостей (37,16%), торакотомия (26,42%), пульмонэктомия (18,87%), лобэктомия (11,32%). Длительность госпитализации составила от 6 до 146 дней, в среднем 35 койко-дней, однако продолжительная госпитализации увеличивалась при наличии ГСО. Пик возникновения гнойных осложнений приходится на 1–4-й послеоперационный день и снижается к более поздним срокам.

**Выводы:**

1. В этиологической структуре госпитальных инфекций в отделении торакальной хирургии преобладают грамотрицательные микроорганизмы: *Pseudomonas aeruginosa* (22,67%), гр. (-) палочки (5,81%) и *Acinetobacter spp.* (5,23%), преимущественно в виде монокультур.

2. Установлено наличие госпитальных ассоциаций. Большинство ассоциаций, циркулирующих в стационаре, обладают низким коэффициентом экологического сродства. между ассоциантами преобладают антагонистические взаимоотношения.

3. Следует учитывать устойчивость грамотрицательный микроорганизмов к аминогликозидам (нетромицин, гентамицин), полусинтетическим пенициллинам (карбенициллин) и цефалоспоринам III поколения (цефоперазон). Для *S. viridans* к оксациллину, линкомицину и клиндамицину.

**Литература**

1. Control Consortium (INICC) Report, Data Summary of 30 Countries, 2005–2010 // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. — 2013. — Vol. 34. – P. 597–604.

2. Голуб, А.В. Новые возможности профилактики инфекций области хирургического вмешательства / А.В. Голуб // КМАХ. — 2011. — №. 13. — С. 56–66.

3. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Пензенской области в 2012 году». — Пенза, 2013 – 275 с.

4. Периоперационная антибиотикопрофилактика / М.В. Кукош [и др.] // Вестн. эксперимент. и клинич. хирургии. — 2012. — № 2.

5. The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed / R. Plowman [et al.] // J. Hosp. Infect. — 2001. — Vol. 47. — P. 198–209.

6. Estimating the proportion of healthcare-associated infections that are reasonably preventable and the related mortality and costs / C.A. Umscheid [et al.] // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. — 2011. — Vol. 32. — P. 101–114.

7. Фадеева Т. В. и др. Микробиологическая оценка послеоперационной раневой инфекции в многопрофильной хирургической клинике / Т.В. Фадеева [и др.] // Инфекции в хирургии. — 2012. — Т. 10, № 4. — С. 14.

## CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NOSOCOMIAL INFECTION PATHOGENS IN THORACIC SURGERY DEPARTMENT

**Mitrofanova N.N., Melnikov V.L., Babayev S.Yu., Zhuravlev R.V.**

*Penza State University, Medical Institute, Penza, Russia*

The article presents the results of the analysis of the structure, the degree of sensitivity of microorganisms to antibiotics, clinical and epidemiological characteristics of nosocomial infections in surgical patients and risk factors of their development in the department of thoracic surgery.

**Keywords:** nosocomial infections, thoracic surgery, antibiotics resistance.

Поступила 06.09.2013

# ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-28В ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С И ВЛИЯНИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОГО ЛЕЧЕНИЯ

**Мицура В.М.[1], Воропаев Е.В.[1], Жаворонок С.В.[2], Осипкина О.В.[1], Терешков Д.В.[3]**

*[1]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь;*

*[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;*

*[3]Гомельская областная инфекционная клиническая больница, Гомель, Беларусь*

**Резюме.** Обследовано 156 пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) (65% мужчины; 62% с генотипом 1 вируса) в Гомеле и Минске. Методом ПЦР определялись единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) гена интерлейкина-28В (ИЛ-28В) 39743165T>G (rs8099917) и SNP 39738787C>T (rs12979860). «Благоприятные» аллельные варианты SNP гена ИЛ-28В у пациентов с ХГС встречались реже, чем в популяции Европейского региона. У пациентов с генотипом 1 вируса гепатита С чаще встречаются мутантные аллели в обеих SNP. Ответ на терапию IFN/RBV был выше при наличии у пациентов «благоприятных» вариантов TT (SNP 39743165T>G) и CC (SNP 39738787C>T). Обследование на SNP 39738787C>T гена ИЛ-28В перед началом терапии IFN/RBV более информативно в качестве прогностического фактора ответа на лечение.

**Ключевые слова:** полиморфизм гена ИЛ-28В, хронический гепатит С, интерферонотерапия.

**Введение.** Распространенность вирусного гепатита С (ВГС) оценивается примерно в 2,2–3,0% мировой популяции. Хронический гепатит С (ХГС) характеризуется прогрессированием фиброза печени и приводит к циррозу печени в 20–30% случаев, риск развития гепатоцеллюлярной карциномы оценивается в 4% [1, 2]. Стандартом помощи пациентам с ХГС в большинстве развитых стран признана комбинированная терапия пегилированным интерфероном альфа и рибавирином (PegIFN/RBV). Критерием эффективности лечения считается достижение стойкого вирусологического ответа (СВО), который определяется как отрицательный результат при исследовании РНК вируса методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) через 6 мес. после лечения. Ведущим предиктором эффективности лечения считается генотип вируса. Эффективность лечения в настоящее время достигает 54–56% в общем, составляя 40–50% для пациентов с генотипом 1 ВГС и 70–80% среди пациентов с генотипами 2/3 ВГС. Особое внимание уделяется прогнозированию результатов лечения у пациентов с генотипом 1 ВГС, т. к. они хуже отвечают на PegIFN/RBV [2, 3].

При ХГС прогрессирование заболевания связано преимущественно не с вирусологическими факторами, а с особенностями макроорганизма. Считается, что определенное влияние на развитие фиброза, результат лечения и его побочные эффекты, а также возможность самостоятельного выздоровления при заражении ВГС оказывают генетические факторы [4]. Фармакогенетика — наука на стыке медицинской генетики и клинической фармакологии, изучающая значение наследственности в реакции организма на медикаменты. С позиций фармакогенетики, восприимчивость пациентов с ХГС к интерферонотерапии зависит от экспрессии в ткани печени стимулированных интерфероном генов, которые в результате и оказывают противовирусный эффект на ВГС [5, 6].

Полиморфизм гена интерлейкина 28В (ИЛ-28В) активно изучается в последние годы. ИЛ-28В является представителем интерферонов-лямбда, или интерферонов 3 типа, обладающих сильным противовирусным действием в отношении ВГС. Было показано, что единичные нуклеотидные замены (SNP) в гене ИЛ-28В коррелировали с ответом на лечение пациентов препаратами PegIFN/RBV [6,7,8]. Более высокую прогностическую ценность для пациентов с генотипом 1 ВГС имеют следующие SNP: 39743165T>G (rs8099917) [6, 7] и 39738787C>T (rs12979860) [8] гена ИЛ-28В (классификация NCBI). Аллель С в rs12979860 ассоциируется с повышенной вирусной нагрузкой, со спонтанным клиренсом ВГС и с вирусологическим ответом во время лечения [8, 9]. Было показано, что rs12979860 из 10 изученных SNP гена ИЛ-28В — самый сильный предиктор для вирусологического ответа у больных ХГС с генотипом 1 ВГС при лечении PegIFN/RBV [10], а аллель С rs12979860 является предиктором скорого снижения вирусной нагрузки и достижения быстрого вирусологического ответа на 4 неделях лечения [9]. Другим наиболее часто изучаемым вариантом полиморфизма был rs8099917, также отражающий СВО у пациентов с генотипом 1 ВГС [6, 7, 8].

Возможности лабораторной диагностики в настоящее время позволяют определять SNP различных генов, в том числе и ИЛ-28В. Это исследование позволяет врачу заранее оценить вероят-

ность ответа на терапию, а, значит, взвесить риск и пользу лечения конкретного пациента. На основе этих SNP разрабатываются подходы к персонифицированной терапии [11].

Европейская ассоциация по изучению печени (EASL) в 2011 году признала, что определение полиморфизмов ИЛ-28В может помочь в оценке вероятности ответа пациента с генотипом 1 ВГС на лечение PegIFN/RBV, однако не должно быть использовано для откладывания терапии у тех, кто ответит с меньшей вероятностью, но сильно нуждается в лечении, т.е. у пациентов с выраженным фиброзом. Полиморфизмы ИЛ-28В могут в меньшей степени помочь пациентам с инфекцией, вызванной ВГС генотипов 2 и 3 [2].

В последнее время установлена взаимосвязь неблагоприятного аллельного варианта TT (39738787C>T) гена ИЛ-28В с присутствием на поверхности естественных киллеров (ЕК) специфических рецепторов NKG2A, CD158e и CD158b. Их наличие соответствует низкой частоте СВО у пациентов с 1 генотипом ВГС. Было показано, что NKG2A чаще наблюдаются у пациентов с отсутствием СВО, а ЕК, экспрессирующие эти рецепторы, не адекватно реагируют на экзогенный интерферон (IFN) [12]. В связи с этим, предложены 3 подхода к выбору оптимальной лечебной тактики на основе иммуногенетических особенностей. Пациентам с благоприятными аллельными вариантами по ИЛ-28В и отсутствием ингибирующих рецепторов на ЕК (NKG2A и CD158e) показана стандартная терапия ПЭГ-ИФН и РБВ. При наличии благоприятного варианта ИЛ-28В в сочетании с ингибирующими рецепторами ввиду «искаженной» реакции на IFN рекомендуется «тройная терапия» с ингибиторами протеазы. Для пациентов, несущих «неблагоприятные» аллели ИЛ-28В в сочетании с ингибирующими рецепторами терапия IFN наименее эффективна, им можно рекомендовать схемы лечения прямыми антивирусными агентами без применения препаратов IFN [13].

Продолжает активно изучаться влияние различных SNP гена ИЛ-28В на исход лечения пациентов с ХГС. Предполагается, что генотипирование rs12979860 и rs8099917 перед началом противовирусного лечения позволит выбрать оптимальную продолжительность лечения у пациентов с 1 генотипом ВГС. Роль данных полиморфизмов в прогрессировании заболевания также нуждается в изучении.

**Цель:** определение частоты встречаемости полиморфизмов гена интерлейкина-28В у пациентов с ХГС и оценка его значения для прогнозирования эффективности противовирусного лечения.

**Материалы и методы.** Обследовано 156 пациентов с хронической ВГС-инфекцией из г. Гомеля и г. Минска. Из них было 102 мужчины (65,4%) и 54 женщины (34,6%) в возрасте от 16 до 75 лет (средний возраст 40,6±0,9 года). У 23 пациентов (14,4%) имелись признаки цирроза печени. Генотип вируса определялся у 149 пациентов, у большинства (62,4%) выявлен генотип 1 ВГС. Получали противовирусную терапию 116 пациентов: 69 с использованием стандартного интерферона (IFN) и RBV и 47 — PegIFN/RBV. Из них генотип 1 ВГС имели 76 человек (63,3%), генотип 2 или 3 — 44 человек (36,7%).

Для выявления SNP 39743165T>G (rs8099917) и SNP 39738787C>T (rs12979860) гена ИЛ-28В (классификация NCBI) использовали метод ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). В качестве материала для исследований использовалась ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови. Детекцию продуктов ПЦР проводили с помощью гель-электрофореза, достоверность полученных данных подтверждена с помощью мелтинга (плавления) рестрикционных фрагментов. Подробнее методика изложена нами ранее [14].

Для сравнения частоты выбранных вариантов полиморфизма гена ИЛ-28В с популяцией Европейского региона были взяты частоты полиморфизмов из базы данных GenBank NCBI.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы STATISTICA v.6.0. Использовались непараметрические критерии: критерий Манна-Уитни для сравнения в независимых группах, критерий $\chi 2$ или точный критерий Фишера для сравнения частот в квадратах 2x2. Для описания данных применялись медиана (Me) и интерквартильный размах (25–75%). Статистически значимой считалась 95% вероятность различий ($p<0,05$). Для расчета 95% доверительного интервала (95% ДИ) в оценке долей использован откорректированный метод Вальда.

**Результаты и их обсуждение.** Определена частота встречаемости SNP 39743165T>G гена ИЛ-28В у 156 пациентов. Генотип TT был выявлен у 79 пациентов, что составило 50,6%; генотип TG — у 66 (42,3%), и генотип GG — у 11 пациентов (7,1%). Для сравнения частоты носительства мутантного аллеля G с литературными данными нами проанализирована база данных GenBank, найде-

но исследование 226 лиц в Европейском регионе [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=8099917]. Генотип TT выявлен у 72,6%, TG — у 24,8%, GG — у 2,7%. Результат представлен в таблице 1.

Таблица 1 — Частоты генотипов и аллелей по SNP 39743165T>G гена ИЛ-28B в группе пациентов и контрольной группе из базы данных GenBank

| Группа | Частоты генотипов (%, 95% ДИ) | | | Частоты аллелей (%, 95% ДИ) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | TT | TG | GG | T | G |
| Группа пациентов с ХГС (n=156) | 50,6 (42,9–58,4) | 42,3 (34,8–50,2) | 7,1 (3,9–12,3) | 71,8 (66,6–76,5) | 28,2 (23,5–33,5) |
| HapMap-CEU ss44192664 (n=226) | 72,6 (66,4–78,0) | 24,8 (19,6–30,8) | 2,7 (1,1–5,8) | 85,0 (81,4–88,0) | 15,0 (12,0–18,7) |

Частота носительства мутантного аллеля G составила в нашем исследовании 28,2%, в популяции HapMap-CEU ss44192664 — 15%, различие статистически значимо ($\chi2$=19,7, p<0,0001). Это можно объяснить спецификой эксперимента ——в нашем исследовании обследованы пациенты с хроническими формами ВГС-инфекции, в то время как существуют данные о том, аллель G чаще встречается у пациентов с хронизацией инфекции по сравнению с реконвалесцентами [6].

Анализ SNP 39738787C>T проводился у 154 пациентов (в двух образцах наблюдали ингибирование ПЦР). Генотип CC был выявлен у 52 пациентов, что составило 33,8%; генотип CT — у 78 (50,7%), и генотип TT — у 24 пациентов (15,6%). Так как в GenBank нами не найдена информация о частоте генотипов в европейской популяции, то в качестве группы сравнения была взята группа обследованных европейцев (642 человека) из исследования зарубежных авторов [9]. В группе сравнения генотип CC был выявлен в 52,4%; генотип CT — в 39,7%, и генотип TT — в 7,9% случаев. Результат представлен в таблице 2.

Таблица 2 — Частоты генотипов и аллелей по SNP 39738787C>T гена ИЛ-28B в группе пациентов и группе сравнения

| Группа | Частоты генотипов (%, 95% ДИ) | | | Частоты аллелей (%, 95% ДИ) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | CC | CT | TT | C | T |
| Группа пациентов с ХГС (n=154) | 33,8 (26,8–41,6) | 50,7 (42,8–58,4) | 15,6 (10,6–22,2) | 59,1 (53,5–64,4) | 40,9 (35,6–46,5) |
| Группа сравнения (n=642) | 52,4 (48,5–56,2) | 39,7 (36,0–43,6) | 7,9 (6,1–10,3) | 72,3 (69,7–74,6) | 27,7 (25,4–30,2) |

Частота аллеля C, который ассоциируется с более частым спонтанным клиренсом ВГС (самопроизвольным выздоровлением от инфекции) в общей популяции России составляет 61,4–64,1% [9], в группе сравнения из Европы — 72,3%. В нашем исследовании у пациентов с ХГС — 59,1% (значимо ниже по сравнению с группой контроля, $\chi2$=20,5; p<0,0001).

Сравнивались результаты исследования частот SNP 39743165T>G и 39738787C>T. Совпадение «благоприятных» генотипов TT и CC соответственно было у 51 чел. (33,1%), гетерозиготных вариантов TG и CT — у 53 чел. (34,4%), мутантных вариантов GG и TT — у 7 (4,5%). У 21 пациента (13,6%) «благоприятный» генотип TT (SNP 39743165T>G) сочетался с генотипом CT (SNP 39738787C>T). «Неблагоприятный» генотип (SNP 39738787C>T) TT у 12 пациентов (7,8%) сочетался с генотипом (SNP 39743165T>G) TG и у 5 (3,2%) — с генотипом TT.

Проанализированы генотипы вируса ВГС (1 или не 1) у лиц с различными вариантами гена ИЛ-28B вне зависимости от назначенной терапии и ее эффективности у 143 пациентов. Представляется интересным, что у лиц с различными генотипами вируса частота вариантов SNP гена ИЛ-28B различается, причем у пациентов с 1 генотипом ВГС чаще встречаются мутантные алле-

ли SNP 39743165T>G, чем с иными генотипами (62,5% и 34,5%; χ2=10,6, p=0,001), как и для SNP 39738787C>T (79,3% и 49,1%; χ2=14,1, p=0,0002).

Сравнивались различные варианты SNP в 2 группах: с прогрессированием ХГС (развитие выраженного фиброза или цирроза) — 22 чел. и отсутствием прогрессирования (при наблюдении свыше 10 лет прогрессии фиброза не отмечено) — 22 чел. Частоты генотипов SNP 39743165T>G и SNP 39738787C>T не различались (χ2=0,37; p=0,54 и χ2=0,05; p=0,83 соответственно).

Сравнение уровней АЛТ в группах с различными генотипами (SNP 39743165T>G) с помощью метода Манна-Уитни не выявило значимых различий между группами (p=0,22). Различий вирусной нагрузки в этих же группах не было выявлено (p=0,85, тест Манна–Уитни). Выявлены более высокие значения АЛТ (Me 114 Е/л, 25-75% 69–180,6) в группе с генотипом CC (SNP 39738787C>T) по сравнению с генотипами CT и TT (Me 69,8 Е/л, 25–75% 54,1–111), статистически значимые (тест Манна-Уитни p=0,016). Возможно, это свидетельствует о более эффективном иммунном ответе у лиц с генотипом CC, сопровождающемся большей выраженностью синдрома цитолиза. Вирусная нагрузка ВГС в этих группах значимо не различалась (p=0,59).

Для исследования роли вариантов SNP гена ИЛ-28B в эффективности противовирусного лечения ХГС обследовано 116 пациентов, которые получали препараты ИФН и рибавирин. Получали стандартный интерферон (ИФН) и рибавирин 69 пациентов, ПЭГ-ИФН/рибавирин – 47 пациентов. Из них генотип 1 ВГС имели 76 человек (63,3%), генотип 2 или 3 – 44 человек (36,7%). Проанализированы результаты лечения препаратами интерферона (вирусологический ответ в конце курса лечения или СВО) у 74 пациентов с ХГС, остальные продолжают лечение или досрочно прервали курс терапии в связи с побочными эффектами терапии или из-за невозможности приобретать препараты. На терапию ответили 15 из 47 (31,9%) пациентов, получавших ИФН и рибавирин, и 9 из 27 (33,3%) пациентов, получавших ПЭГ-ИФН/рибавирин. Учитывая, что частота ответа в этих двух группах не различалась (χ2=0,02; p=0,90), для дальнейшего анализа они были объединены.

Проанализирована частота ответа на противовирусное лечение у пациентов с ХГС с различными аллельными вариантами гена ИЛ-28B в общей группе пациентов и у лиц с 1 генотипом ВГС (таблица 3). Ответ на терапию был ниже у лиц с 1 генотипом ВГС по сравнению с иными генотипами (χ2=21,8, p<0,0001).

Таблица 3 — Частота ответа на противовирусное лечение у пациентов с ХГС с различными аллельными вариантами гена ИЛ-28B

| SNP генов ИЛ-28B (n) | Варианты генотипов | Ответ, % (95% ДИ) (все пациенты) | Ответ, % (95% ДИ) (пациенты с генотипом 1 ВГС) |
|---|---|---|---|
| ИЛ-28B 39743165T>G (n=74) | TT | 50,0 (32,6–67,4) | 35,7 (16,2–61,4) |
| | TG | 23,7 (12,8–39,4) | 9,7 (2,6–25,7) |
| | GG | 12,5 (0,1–49,2) | 0 (0–40,4) |
| ИЛ-28B 39738787C>T (n=74) | CC | 70,6 (46,6–87,0) | 66,7 (29,6–90,8) |
| | CT | 22,5 (12,1–37,7) | 12,1 (4,2–27,9) |
| | TT | 17,7 (5,4–41,8) | 0 (0–26,6) |

При сравнении частот «благоприятных» гомозиготных носительств TT и CC у ответивших и не ответивших на интерферонотерапию выявлено, что частота генотипа TT (SNP 39743165T>G) была выше у ответивших (58,3%), чем у неответивших (28%, χ2=6,3, p=0,012). Частота CC (SNP 39738787C>T) у ответивших (50,0%) была значительно выше, чем у неответивших (10%, χ2=14,7; p=0,0001). Ответ на лечение при наличии «неблагоприятных» гомозиготных вариантов GG (SNP 39743165T>G) или TT (SNP 39738787C>T) был выявлен лишь у лиц со 2 или 3 генотипом ВГС. Ни у одного из пациентов с 1 генотипом ВГС ответа на терапию не было.

Рассчитывалось отношение шансов (ОШ, 95% ДИ) ответа на терапию у пациентов с «благоприятным» генотипом TT (SNP 39743165T>G) по сравнению с генотипами TG или GG, ОШ = 3,6 (1,3–10,0). Для генотипа CC (SNP 39738787C>T) по сравнению с генотипами CT или TT, ОШ = 9,0 (2,7–30,6). Это доказывает более высокую прогностическую ценность определения SNP 39738787C>T по сравнению с SNP 39743165T>G.

У лиц с генотипом CC (SNP 39738787C>T), получающих «стандартные» интерфероны, эффективность интерферонотерапии была 66,7%, что выше, чем у лиц с иными аллельными вариантами (15,6%), ОШ=9,5 (2,4–37,9).

Была проанализирована эффективность терапии при сочетании различных аллельных вариантов SNP 39743165T>G и SNP 39738787C>T. Наилучшие результаты лечения (СВО 70,6%) соответствовали сочетанию «благоприятных» вариантов TT и CC, соответственно. При сочетании гетерозиготных вариантов TG и TT СВО составил 24,1%. Одинаковая частота СВО (22,2%) соответствовала сочетаниям TT (SNP 39743165T>G) + CT (SNP 39738787C>T) и TG+TT (соответственно). При сочетание мутантных вариантов (GG и TT) СВО наблюдался у 16,7% пациентов с 3 генотипом ВГС.

**Выводы.** Частота выявления носительства мутантных аллелей G (SNP 39743165T>G) и T (SNP 39738787C>T) среди пациентов с хронической ВГС-инфекцией в Гомельском регионе выше, чем в Европейской популяции, что подтверждает роль «благоприятных» аллелей в элиминации вируса при острой инфекции. У пациентов с 1 генотипом ВГС чаще встречаются мутантные аллели в исследованных SNP гена ИЛ-28B. Эти факторы являются взаимно отягощающими и уменьшают вероятность ответа на терапию у пациентов с 1 генотипом вируса.

Повышенные значения АЛТ у пациентов с ХГС чаще соответствовали варианту CC SNP 39738787C>T, по сравнению с вариантами CT и TT, что может свидетельствовать о большей активности иммунного цитолиза. Вирусная нагрузка ВГС в этих группах значимо не различалась. Связь полиморфизма гена ИЛ-28B с прогрессированием заболевания также не было выявлено.

Нами подтверждается высокая прогностическая ценность определения SNP 39743165T>G гена ИЛ-28B при противовирусном лечении. Ответ на терапию IFN и RBV был выше при наличии у пациентов «благоприятных» вариантов TT (SNP 39743165T>G) и CC (SNP 39738787C>T), при гомозиготном носительстве «неблагоприятных» вариантов GG (SNP 39743165T>G) и TT (SNP 39738787C>T) ни один из больных с 1 генотипом ВГС на терапию не ответил. Определение SNP 39738787C>T имеет более высокую прогностическую ценность по сравнению с определением SNP 39743165T>G. При сочетании «благоприятных» аллельных вариантов частота СВО составляет 70,6%. Обследование на SNP 39738787C>T гена ИЛ-28B можно рекомендовать перед началом противовирусного лечения всем пациентам с генотипом 1 ВГС в качестве прогностического фактора ответа на лечение. При «благоприятных» аллельных вариантах можно ожидать высокую эффективность лечения не только пегилированными, но и «стандартными» интерферонами.

**Литература**


1. Lavanchy, D. The global burden of hepatitis C / D. Lavanchy // Liver Int. — 2009. — Vol.29, Suppl. 1. — P. 74–81.
2. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection // J. Hepatol. — 2011. — Vol. 55. — P. 245–264.
3. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. / M.G. Ghany [et al.] // Hepatology. — 2009. — Vol. 49. — P. 1335–1374.
4. Rau, M. Host genetic variants in the pathogenesis of hepatitis C / M. Rau, K. Baur, A. Geier // Viruses. — 2012. — Vol. 4. — P. 3281–3302.
5. Clark, P.J. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies / P.J. Clark, A.J. Thompson, J.G. McHutchison // Am. J. Gastroenterol. — 2011. — Vol. 106, № 1. — P. 38–45.
6. Hepatitis C pharmacogenetics: State of the art in / N.H. Afdhal [et al.] // Hepatology. — 2011. — Vol. 53, № 1. — P. 336–345.
7. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance / D. Ge [et al.] // Nature. — 2009. — Vol. 461. — P. 399–401.
8. Interleukin- 28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus / A.J. Thompson [et al.] // Gastroenterology. — 2010. — Vol. 139. — P. 120–129.
9. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus / D.L. Thomas [et al.] // Nature. — 2009. — Vol. 461. — P. 798–801.
10. IL28B SNP rs12979860 is a critical predictor for on-treatment and sustained virologic response in patients with hepatitis C virus genotype-1 infection / C.Y. Lin [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6, № 3. — E. 18322.
11. Slev, P. Host genomics and HCV personalized medicine / P.Slev // Ann. Clin. Lab. Sci. — 2012. — Vol. 42, № 4. — P. 363–369.
12. Natural killer inhibitory receptor expression associated with treatment failure and interleukin-28B genotype in patients with chronic hepatitis C / L. Golden-Mason [et al.] // Hepatology. — 2011. — Vol. 54, № 5. — P. 1559–1569.
13. Федосеева, Н.В. Иммуногенетические факторы взаимодействия вируса гепатита С и человека и возможности выработки терапевтической тактики / Н.В. Федосеева, О.О. Знойко, Н.Д. Ющук // Журн. микробиол. — 2013. — № 3. — С. 97–103.
14. Полиморфизм генов интерлейкина-28B и клиническое значение его выявления у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С / В.М. Мицура, Е.В. Воропаев, О.В. Осипкина, С.В. Жаворонок // Лабораторная диагностика Восточная Европа. — 2012. — № 2 (02). — С. 86–97.

## THE INTERLEUKIN 28B GENE POLYMORPHISM IN CHRONIC HEPATITIS C AND ITS INFLUENCE FOR ANTIVIRAL THERAPY EFFFECTIVENESS

**Mitsura V.M.[1], Voropaev E.V.[1], Osipkina O.V.[1], Zhavoronok S.V.[2], Tereshkov D.V.[3]**

*[1]Gomel State Medical University, Gomel, Belarus;*

*[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;*

*[3]Gomel Regional Infectious Clinical Hospital, Gomel, Belarus*

The study involved 156 patients with chronic hepatitis C (CHC) (65% men, 62% with hepatitis C virus (HCV) genotype 1) in Gomel and Minsk. Single nucleotide polymorphisms (SNP) of the gene IL28B 39743165T>G (rs8099917) and SNP 39738787C> T (rs12979860) were determined by polymerase chain reaction. "Favorable" SNP allelic variants of IL28B gene in patients with CHC were less common vs. European population. In patients with HCV genotype 1, mutant alleles in both SNPs were more common vs. those with other genotypes. Response to IFN/RBV therapy was better in patients with "favorable" genotypes TT (SNP 39743165T>G) and CC (SNP 39738787C>T). None of the patients with HCV genotype 1 who had GG and TT variants, respectively, responded to the therapy. Testing for SNP 39738787C>T of IL28B gene before starting IFN/RBV therapy can be recommended for all patients with genotype 1 HCV as a predictor of treatment response.

**Keywords:** IL28B gene polymorphism, chronic hepatitis C, interferon therapy.

Поступила 02.09.2013

## АЛЬФА-ДЕФЕНЗИНЫ — МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ НЕЙТРОФИЛОВ: РОЛЬ В ВОСПАЛЕНИИ И ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

**Нашкевич Н.Н.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе приведен анализ современных исследований роли миелоидных дефензинов в инфекционно-воспалительной патологии человека. Акцент сделан на альфа-дефензинах, мощных эндогенных антимикробных пептидах нейтрофилов, описанном для них широком спектре биологических эффектов в организме человека, и в особенности на их роли в развитии воспаления. Особое внимание уделено работам белорусских ученых, посвященным изучению механизмов действия этих пептидов при системных воспалительных реакциях организма человека. Показана роль понимания механизмов развития патологий с участием α-дефензинов в поиске диагностических и прогностических маркеров, а также средств терапии соответствующих патологических состояний.

**Ключевые слова:** альфа-дефензины, эндогенные антимикробные пептиды, полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты, цитотоксичность, системный воспалительный ответ.

**Введение.** В течение последних двадцати лет представления о нейтрофильных α-дефензинах, об их физиологической роли и месте в патогенезе заболеваний человека значительно пополнились. От функций эволюционно консервативных микробицидов врожденного иммунитета с широким спектром антимикробного действия роль этих катионных пептидов расширилась в сознании современных исследователей до мультифункциональных эффекторных молекул нейтрофилов с не менее широким спектром действия в реакциях человеческого организма. Белорусскими учеными также внесен вклад в расширение представлений о механизмах действия этих молекул, которое не всегда можно охарактеризовать как исключительно полезное и защитное. Как считают сегодня, это мощное «оружие» в борьбе с микроорганизмами может стать деструктивным звеном при развитии патологических состояний, связанных с дисрегуляцией воспаления. Данные о роли нейтрофильных α-дефензинов в патологии человека многообразны и неоднозначны, но их накопление важно для развития знаний и подходов в диагностике и лечении инфекционно-воспалительных заболеваний человека.

***Альфа-дефензины нейтрофилов человека.*** Полиморфно-ядерные нейтрофильные гранулоциты (ПМН), преобладающие среди лейкоцитов крови (около 70%) клетки-фагоциты — важнейший

элемент врожденного иммунитета человека. Их характерной особенностью является высокое содержание мощных биологически активных веществ (протеолитических ферментов и натуральных антибиотиков, преимущественно катионных белков) — эффекторов неспецифической противомикробной защиты организма. Синтезируемые клеткой в больших количествах и запасаемые в клеточных гранулах, они способны к весьма эффективной микробицидной защите от инвазии микробных агентов, во-первых, действуя внутриклеточно при фагоцитировании микробов и, во-вторых, экстраклеточно в результате внезапной дегрануляции при активации ПМН микробными и воспалительными стимулами. При высвобождении из гранул микробициды накапливаются в высоких концентрациях, которые многократно повышаются локально при инфильтрации нейтрофилами тканей в очаге инфекции[1, 2].

Дефензины являются богатыми цистеином катионными пептидами с молекулярной массой 3–4 кДа, которые выступают как эндогенные антибиотики, нарушающие целостность мембран микроорганизмов, представляя один из древних механизмов врожденного иммунитета. Дефензины млекопитающих экспрессируются в фагоцитах и специализированных клетках слизистых оболочек. Они довольно консервативны в структурно-функциональном отношении, но делятся на семейства в зависимости от некоторых структурных особенностей. Существуют α-, β- и ɵ-дефензины, которые имеют разную локализацию и спектр антимикробного действия в организме [1, 2].

У ПМН человека преобладают альфа-дефензины (human neutrophil peptides, HNP-1, -2, -3, -4). Они содержатся в азурофильных гранулах нейтрофилов в значительных количествах (составляют около 5% общего клеточного белка). Это позволяет ПМН эффективно нейтрализовать инфекционные агенты любой природы как внутри фаголизосомы, так и во внеклеточном пространстве после дегрануляции содержимого гранул чаще всего в ответ на наиболее значимый для ПМН хемотаксический и активирующий стимул — α-хемокин интерлейкин-8 (ИЛ-8)[1-3]. В отличие от других катионных антимикробных белков и дефензинов немиелоидного генеза (β-дефензинов, дефензинов клеток Панета и др.), продукция которых, в основном, индуцируется в ответ на воспалительные стимулы, нейтрофильные HNP синтезируются конститутивно, накапливаются и изолируются в отдельных компартментах (гранулах) ПМН [1, 2]. Альфа-дефензины синтезируются в виде предшественника из 94-х аминокислот, который включает сигнальный пептид (1–19), анионный пептид (20–64) и катионный пептид (65–94), соответствующий HNP [4]. Анионный пептид (20-46) блокирует микробицидность и цитотоксичность HNP. Последовательность 40–51 контролирует микробицидность итогового пептида и транспортировку зрелого HNP в клеточные гранулы.

Локус дефензиновых генов (DEFA1 и DEFA3 гены, кодирующие HNP-1 и -3, соответственно) находится на восьмой хромосоме и описан как один из наиболее вариабельных по числу генных копий в геноме человека [2].

***Биологическая активность альфа-дефензинов.*** Показано мощное антимикробное действие всех четырех HNP в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, простейших, грибов и вирусных патогенов, в том числе оболочечных вирусов, таких как вирус гриппа, ВИЧ, вирусы простого герпеса первого и второго типов, некоторые типы аденовирусов, цитомегаловирусы и т. д. [1–3].Особо велика роль HNP как эндогенного антибиотика в инфекционной патологии человека. Свои функции они выполняют не только в фагоцитах, но и в барьерных эпителиальных тканях и физиологических жидкостях, где обычно отмечается повышение концентраций HNP при развитии патологии. Так, повышенные уровни HNP отмечены в бронхоальвеолярной жидкости больных пневмонией, туберкулезом, при вирус-индуцированной бронхиальной астме и муковисцидозе. Недостаточность синтеза этих антимикробных пептидов, вызванная генетическими дефектами и нарушениями, связанными с их экспрессией и регуляцией (приводящих, например, к незавершенному фагоцитозу ПМН), выступают патогенетическими механизмами ряда инфекционных заболеваний и иммунодефицитных состояний. Описана также их роль в развитии аллергических осложнений, которые могут быть связаны с участием дефензинов в активации тучных клеток[2, 3, 5–7].

С другой стороны, отмечена роль α-дефензинов в развитии патологий неинфекционного характера, которые могут быть связаны с их гиперпродукцией (некоторые заболевания кожи, аллергические состояния и даже онкологические изменения), поскольку в силу своей катионности они могут губительными для эукариотических клеток в отсутствие защитных белковых факторов организма, обладают исключительной способностью сорбироваться на белках и клетках и могут долго

сохраняться в тканях даже после гибели короткоживущих ПМН в очаге инфильтрации, вызывая самые разнообразные физиологические эффекты [6, 7].

К настоящему времени проведены многочисленные исследования биологических активностей дефензинов *in vitro* и *in vivo*, накоплены экспериментальные данные и сведения о молекулярно-клеточных механизмах, через которые HNP опосредуют свое действие, доказательства участия этих молекул в патогенезе ряда воспалительных заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

Кроме прямого антимикробного действия внеклеточные HNP обнаруживают целый спектр биологических эффектов, влияющих на различных стадиях иммунного процесса, проявляют способность усиливать либо ослаблять различные механизмы врожденного и адаптивного иммунитета. Они выступают как опсонины и даже как хемокины: привлекают в очаг инфекции различных участников иммунных реакций, например, незрелые дендритные клетки, моноциты и Т-клетки. Описаны такие эффекты HNP как усиление пролиферации и созревания ряда клеток иммунной системы, способность усиливать клеточную экспрессию молекул адгезии и главного комплекса гистосовместимости, а также модулирование синтеза самыми различными клетками провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [2, 6–8].

Многочисленные сообщения о влиянии α-дефензинов на такие процессы, как ангиогенез и фибринолиз, фиброгенез и секрецию муцина, ремодуляцию тканей слизистых и т. д., могут указывать на их роль в патогенезе локального воспаления, например, воспалительных заболеваний слизистых оболочек [2].

В то время как в локальное воспаление могут быть вовлечены немиелоидные катионные белки, в развитии системного воспалительного ответа (СВО) главная роль безусловно принадлежит HNP. Системная активация и дегрануляция ПМН рассматривается сегодня как «нейтрофильная катастрофа» в кровяном русле, которая лежит в основе развития СВО, септического шока и мультиорганной дисфункции при системных гнойно-воспалительных заболеваниях, осложнениях после тяжелых травм, ожогов и т. д.

Процессы экстравазации ПМН и других клеток при воспалении, инфильтрация и активация клеток в очагах инфекции, клеточная дифференцировка, фагоцитоз, дегрануляция, тканевая репарация и ингибирование воспаления контролируются цитокинами, их рецепторами, молекулами адгезии, костимуляторными факторами и факторами роста. На все эти молекулы и их функции прямо либо косвенно могут влиять HNP, как усиливая, так и ингибируя соответствующие процессы [8].

Было показано, что миелоидные дефензины могут участвовать в регуляции воспаления за счет способности стимулировать экспрессию фактора некроза опухолей-альфа (ФНО-α), интерлейкина-1β и ИЛ-8 в моноцитах крови человека и подавлять у них экспрессию противовоспалительного цитокина ИЛ-10 [8, 9]. Таким образом, HNP выступают как мощные провоспалительные факторы. Функционирование такого механизма может иметь значение при локальном воспалении, повышая инфильтрацию воспаленной ткани нейтрофилами и их активацию [8–10]. Не исключена провоспалительная роль дефензинов и в системном воспалительном ответе. Следует отметить важность регуляции вышеуказанных цитокинов у моноцитов и эндотелиальных клеток в патогенезе вирусных заболеваний, сопряженных с тяжелыми системными реакциями. Например, инфекция моноцитов и эндотелиальных клеток вирусом Ласса из группы особо опасных инфекций практически полностью ингибировала у них экспрессию ИЛ-8 и ФНО-α, что является патогенетическим механизмом развития иммунной депрессии в тяжелых (летальных) случаях геморрагической лихорадки Ласса [11].

Уже доказана роль β-дефензинов в индукции синтеза такого важного воспалительного медиатора как ИЛ-8, с которым связаны многие патогенетические механизмы (например, индукция дисфункции нейтрофилов). Эксперименты проводились, в основном, на клетках бронхо-альвеолярного тракта, где роль в патогенезе локального воспаления доказана как для β-, так и для α-дефензинов [10, 12].

Особый интерес представляют исследования, которые демонстрируют способность HNP активировать синтез ИЛ-8 в клетках моноцитарно-макрофагального ряда, наиболее важных продуцентах воспалительных цитокинов, а также в цельной крови человека [8, 9, 13, 14]. Показано, что HNP при этом индуцируют фосфорилирование и активацию митоген-активированных протеинкиназ, экстраклеточной сигнал-регулируемой киназы 1/2 и p38, поскольку специфические ингибиторы их активности подавляли HNP-индуцированный синтез ИЛ-8 в клеточных культурах моноцитов и макрофагов [14].

HNP обнаруживаются в плазме крови больных при инфекционном сепсисе, тяжелых ожогах, массивных травмах, в высоких концентрациях, достигающих 10 мкМ, определяемых методом твердофазного ИФА [15–18]. В экспериментах *in vitro* при добавлении HNPк цельной донорской крови в диапазоне обнаруженных концентраций (1-100 мкМ) отмечали значимую продукцию ИЛ-8. Этот механизм указывает на участие ПМН в развитии СВО при патологии через действие альфа-дефензинов, которые, таким образом, могут влиять на тяжесть патологического процесса [18].

Показана также индукция ИЛ-8 α-дефензинами в клетках другого тканевого происхождения: эпителиальных, эндотелиальных, почечно-эмбриональных, дендритных клетках и т. д. [12, 14]. Таким образом, высокие концентрации дефензинов системно или локально могут индуцировать или усиливать воспалительный ответ через индукцию ИЛ-8 в клетках самого различного тканевого происхождения, среди которых моноциты и макрофаги, предположительно, являются наиболее реактивными и потенциально мощными продуцентами провоспалительных цитокинов.

Показано, что индукторами ИЛ-8 у клеток вообще, и в особенности у моноцитов и макрофагов, могут быть стрессовые факторы различной природы, к числу которых можно отнести и действие катионных пептидов на мембраны эукариотических клеток. Так HNP могут выступать деструктивным стрессовым фактором при неадекватной (чрезмерной либо аномально локализованной) продукции дефензинов в тканях либо кровотоке и, таким образом, запускать патогенные реакции [6, 7, 19–21].

Перспективы использования альфа-дефензинов. Изучение роли цитокинов и микробицидов нейтрофилов в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний важно не только для понимания развития патологических состояний, но и для поиска новых диагностических и прогностических маркеров, а также средств терапии соответствующих патологий.

Довольно трудно контролировать и проводить мониторинг дефензинов in situ при локальном воспалении. Однако определение уровней HNP и их взаимосвязь с уровнями других индуцируемых дефензинами цитокинов в плазме крови больных при СВО может оказаться информативным в прогностическом или диагностическом отношении. Хотя в настоящее время диагностическая ценность определения уровней α-дефензинов в крови остается спорной.

Интересным, с практической точки зрения, представлялось определение изменение уровня миелоидных дефензиновв физиологических жидкостях при системных заболеваниях наряду с такими важными маркерами воспаления, как ИЛ-8, ФНО-α и его рецептор p55. Однако определение содержания HNP в крови и ликворе детей с генерализованными формами менингококковой инфекции показало целесообразность использования этого показателя в качестве маркера СВО только в спинномозговой жидкости пациентов: уровень дефензинов при положительной динамике болезни снижался существенно быстрее, чем уровень p55. Наиболее показательным маркером в крови пациентов был все же p55, с которым хорошо коррелировал уровень эндотелиальной формы ИЛ-8, но не HNP [16, 17].

Плейотропное действие дефензинов, о котором свидетельствуют современные исследования, сложно и многогранно и порой вызывает сомнение в настолько широком его спектре. Впрочем, физико-химические свойства этих молекул, с одной стороны, эволюционная консервативность и распространенность катионных пептидов вообще в организмах эукариот, с другой стороны, могут вполне выступать в поддержку сложившегося на сегодняшний день представления о дефензинах как о мультифункциональных эффекторах иммунной системы человека.

В настоящий момент активно исследуются ассоциации дефектов и копийности дефензиновых генов с восприимчивостью их носителей к инфекциям, риском развития у них септических состояний, хронических воспалительных процессов, с тяжестью и продолжительностью патологий.

Изучение свойств и биологической активностикатионных антимикробных пептидов различного происхождения создает основу для разработки новых антимикробных субстанций, которые могли бы стать альтернативой современным синтетическим антибиотикам, часто индуцирующим механизмы резистентности у патогенных микроорганизмов. Как собственные микробициды человека дефензины хорошо утилизируются в человеческом организме, обладают выраженными бактерицидными, вирулицидными и фунгицидными свойствами и редко вызывают устойчивость патогенов. Однако препятствием к клиническому применению искусственных антимикробных средств на их основе являются, прежде всего, цитотоксичность, проявляемая дефензинами в отношении собственных клеток человека, а также их плейотропное действие на весь организм — свойства, которые трудно контролировать в условиях *in vivo*. Считают, что решение проблемы может быть связано

с применением рекомбинантных технологий, позволяющих корректировать биологическую активность пептидов.

Другим важным аспектом в создании терапевтических средств для дефензин-ассоциированных заболеваний является поиск способов направленного влияния на патологические реакции, в которые вовлечены дефензины, в том числе при локальном и системном воспалительном процессе. Особо перспективными могли бы стать препараты, дающие возможность регуляции продукции дефензинов либо способные нейтрализовать их патофизиологические активности.

Имеются данные о способности синтетического пептида, соответствующего последовательности предшественника HNP (аминокислоты 38–56 пептида) подавлять индукцию синтеза ИЛ-8 и цитотоксические эффекты HNP в культуре макрофагов человека, что создает перспективу разработки синтетического пептидного антагониста α-дефензинов человека[18].

Среди белорусских исследователей значимый вклад в развитие исследований миелоидных дефензинов внесли несколько поколений сотрудников лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии НИИ гематологии и трансфузиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь. В течение нескольких десятилетий под руководством д.м.н. Н.Н. Войтенка они изучали структуру, функции и роль цитокинов и эндогенных микробицидов в норме и в патогенезе ифекционно-воспалительных заболеваний [8, 9, 11, 13–21]. Большие успехи были достигнуты учеными в разработке иммуноферментных тест-систем для исследования закономерностей продукции этих факторов в системах *in vitro* и *in vivo* [21–24].Своими исследованиями и научными разработками они внесли важный вклад в понимание механизмов развития патологий, поиск диагностических и прогностических маркеров и совершенствование способов терапии патологических состояний.

**Выводы.** На сегодняшний день доказаны роль HNP как эндогенного антибиотика в инфекционной патологии человека, а также причастность этих пептидов к патогенезу ряда заболеваний неинфекционной природы. Наряду с физиологической ролью натуральных дезинфектантов и иммуномодуляторов показано участие HNP в развитии деструктивных патогенетических механизмов локального и системного воспаления. Важный вклад в изучение механизмов действия миелоидных дефензинов в норме и их роли в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний внесли белорусские ученые. Изучение роли HNP при патологии, а также разработка путей специфической нейтрализации HNP важны для совершенствования методов диагностики и лечения заболеваний человека, патогенез которых связан с местным или системным воспалительным ответом.

**Литература**


1. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity / T. Ganz// Nat. Rev. Immunol. — 2003. — Vol. 3. — P. 710–720.
2. Lehrer. R.I. Multispecific myeloid defensin s/ R.I. Lehrer // Curr. Opin. Hematol. — 2007. — Vol. 14. — P. 16–21.
3. Klotman, M.E. Defensins in innate antiviral immunity / M.E. Klotman, T.L. Chang // Nat. Rev. Immunol. — 2006. — Vol. 6. — P. 447–456.
4. Liu, L. The pro-region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting / L. Liu, T. Ganz // Blood. — 1995. — Vol. 85. — P. 1095–1103.
5. Yang, D. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal / D. Yang [et al.] // Trends Immunol. — 2002. — Vol. 23. — P. 291–296.
6. Lichtenstein, A.K. Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity / A.K. Lichtenstein // J. Immunol. — 1988. — Vol. 140. — P. 2686–2694.
7. Smith, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword / J.A. Smith // J. Leukoc. Biol. — 1994. — Vol. 56. — P. 672–686.
8. Chaly, Y.V. Neutrophil α-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells / Y.V. Chaly [et al.] // Eur. Cytokine Netw. — 2000. — Vol. 11. — P. 257–266.
9. Misuno, N.I. Effects of human defensin HNP-1 on the production of tumor necrosis factor-α by human blood monocytes *in vitro* / N.I. Misuno[et al.] // Biull. Eksp. Biol. Med. — 1992. — Vol. 113. — P. 524–527.
10. Sakamoto, N. Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells / N. Sakamoto [et al.] // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. — 2005. — Vol. 288. — P. 508–513.
11. Lukashevich, I.S. Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression / I.S. Lukashevich [et al.] // J. Med. Virol. — 1999. — Vol. 59. — № 4. — P. 552–560.
12. Van Wetering, S. Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells / S. Van Wetering [et al.] // Am. J. Physiol. — 1997. — Vol. 272. — P. 888–896.
13. Чалый, Ю.В. Влияние радикалов кислорода, NO, повреждающих цитоскелет агентов, нейтрофильных дефензинов и фактора некроза опухолей-α на экспрессию гена интрелейкина-8 в человеческих клеточных линиях / Ю.В.Чалый, Н.Н. Нашкевич, Н.Н.-Войтенок // Инфекция и иммунитет: материалы науч.-практ. конф., посвящ.й 75-летию БелНИИЭМ. — Минск, 1999. — С. 557–558.

14. Chaly. Y.V. The induction of IL-8 in various cells by human alpha-defensins: different mechanisms of IL-8 induction by neutrophil defensins in monocytic and non-monocytic cells / Y.V. Chaly[et al.] //Abst. of 8th John Humphrey Advanced Summer Program in Immunology, Moscow, Sept. 10–14, 2007. — Moscow, 2007. — P. 10.

15. Panyutich, A.V. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis/ A.V. Panyutich [et al.] // J. Lab. Clin. Med. — 1993. — Vol. 122. — P. 202–207.

16. Кудин, А.П. Содержание некоторых цитокинов в крови и ликворе детей с генерализованными формами менингококковой инфекции /А.П. Кудин [и др.] // Мед. новости. — 2001. — № 10. — С. 66–68.

17. Акалович, С.Т. Содержание растворимого рецептора ФНО р55, альфа-дефензинов и ИЛ-877 и ИЛ-872 форм интерлейкина-8 в крови и ликворе детей с генерализованными формами менингококковой инфекции / С.Т. Акалович[и др.] // Мед. иммунология. — 2005. — Т. 7. — С. 575–578.

18. Чалый, Ю.В. Нейтрализация цитотоксической и провоспалительной активности нейтрофильных дефензинов человека с помощью синтетического пептидного антагониста / Ю.В. Чалый [и др.] //Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: сб. тр. IV съезда гематологов и трансфузиологов, Минск, 24–25 мая 2012 г. / Респ. науч.-практ. центр трансфузиологии и мед. биотехнологий. — Минск, 2012. — С. 238–240.

19. Чалый, Ю.В. Интерлейкин-8 как сигнальная молекула повреждения клетки / Ю.В. Чалый, Н.Н.Нашкевич, Н.Н.Войтенок // Актуальные проблемы иммунологии и аллергологии: материалы IV съезда Белорусс. науч. о-ва иммунологов и аллергологов. — Гомель, 2000. — С. 341–342.

20. Chaly, Y. Cell stress conditions induce expression of IL-8 in different cell lines / Y. Chaly, N. Nashkevich, N.Voitenok // J. Leuk. Biol. — 2000. — Suppl. — P. 14.

21. Нашкевич, Н.Н. Эндотелиальная форма интерлейкина-8: изучение продукции моноцитами человека с помощью моноклональных антител / Н.Н. Нашкевич [и др.] // Докл. НАНБ. — 2002. — Т. 46, № 1. — С. 82–85.

22. Panyutich, A.V. An enzyme immunoassay for human defensins / A.V.Panyutich [et al.] // J. Immunol. Methods. — 1991. — Vol. 141. — P. 149–155.

23. Nashkevich, N.N. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) / N.N. Nashkevich [et al.] // J. Immunol. Meth. — 2002. — Vol. 270. — P. 37–51.

24. Петевка, Н.В. Иммуноферментный метод определения растворимого р55 рецептора ФНО человека / Н.В. Петевка [и др.] // Клиническая аллергология и иммунология. Иммунодиагностика и иммунореабилитация: сб. тр. 2-й Междунар. конф. и I съезда БААКИ. — Минск; Витебск, 1998. — С. 193–195.

## ALFA-DEFENSINS — MULTIFUNCTIONAL MOLECULES OF NEUTROPHILS: THE ROLE IN INFLAMMATION AND IN INFECTIOUS HUMAN PATHOLOGY

**Nashkevich N.N.**

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

The article presents an analysis of the current reports on the role of myeloid defensins in human inflammatory and infectious pathology with an accent on the neutrophil α-defensins as strong endogenous antimicrobial peptides, on the currently evidenced for these peptides different biological effects in human organism, and especially on their contribution to local and systemic inflammatory disorders. In the scope of special interest are the reports of Belarusian investigators studying the mechanisms of action and immunomodulative and pathological effects of α-defensins in human systemic inflammatory responses, trying to use the understanding of pathological mechanisms involving myeloid α-defensins in development of diagnostic and prognostic markers and therapeutic trials for treatment of the corresponding pathological disorders.

**Keywords:** alpha-defensins, endogenous antimicrobial peptides, polymorphonuclear neutrophil granulocytes, cytotoxicity, systemic inflammatory response.

Поступила 06.09.2013

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ САЛЬМОНЕЛЛ КАК ВАЖНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЭПИДНАДЗОРА ЗА КЛИНИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ

**Носова Е.С., Титов Л.П.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Для типирования нетифоидных сальмонелл вида *S. enterica* проведен ПЦР-ПДРФ анализ генов флагеллина (*fljB*) и белка теплового шока (*groEL*). Выявлен полиморфизм изучаемых

генов, кодирующих факторы патогенности. Внутривидовое типирование штаммов *S. enteritidis* по гену *fljB* позволяет дифференцировать изоляты внутри серогруппы.

**Ключевые слова:** сальмонеллы, типирование, ПЦР-ПДРФ, флагеллин, полиморфизм генов.

**Введение.** Бактерии рода *Salmonella* циркулирует среди животных и людей с множественностью путей передачи инфекции. В большинстве случаев *Salmonella* вызывает вспышки с пищевым путем передачи инфекции [1, 2]. В структуре заболеваемости ОКИ в республике сальмонеллезные инфекции занимают второе место после ротавирусных гастроэнтеритов.

Фенотипические методы играют важную роль в идентификации сальмонелл на уровне рода. Культуральный метод позволяет идентифицировать сальмонеллы на основании биохимической активности, антибиотикорезистентности, серотипирования. Серотипирование используется для первичного типирования изолятов, данные фаготипирования и антибиотикограмм дополняют разделение внутри серотипов, и помогают выявлять эпидемиологические связи между отдельными спорадическими заболеваниями и вспышками [3]. Однако, в связи с большим количеством распознаваемых серотипов (более 2400) серотипирование сальмонелл является процедурой достаточно трудоемкой.

В последние годы для внутривидового типирования сальмонелл широко применяются молекулярно-генетические методы, основанные на анализе плазмидной или хромосомной ДНК [3–5]. Стандартными методами типирования сальмонелл, применяемые в мире являются (пульс-электрофорез (PFGE), полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), мультилокусное сиквенс типирование (MLST). Важным фактором патогенности сальмонелл являются фимбрии (Н антиген). Сальмонеллы экспрессируют два антигенно разнородных флагеллина, кодируемые генами *fliC* и *fljB*. В настоящее время гены, кодирующие синтез флагелина рассматривают как модель для изучения генетической дифференциации, так как в них постоянно происходят нуклеотидные замены, приводящие к изменению синтеза и полимеризации флагеллина [6, 7]. Белки теплового шока выполняют защитную для клетки функцию и индуцируют аутоиммунные процессы, необходимы для роста бактерий, играют роль в репликации F-плазмиды и делении клетки. Ген *groEL* кодирует белки теплового шока, которые относятся к семейству HSP60.

**Цель:** провести типирование изолятов S. enterica, выделенных от больных и носителей, на основании ПЦР-ПДРФ анализа генов флагеллина (*fljB*) и белка теплового шока (*groEL*).

**Материалы и методы.** В исследование включены 130 клинических штаммов *Salmonella spp.* серологических групп B, D, C, E, выделенные из клинического материала от пациентов с клиническими проявлениями дисбактериоза кишечника (n=20) и острыми гастроэнтеритами (n=30) и бактерионосителей (n=85).

***Бактериологическое исследование.*** Первичный посев материала проводили на дифференциально — диагностические среды (Эндо, Левина, агар МакКонки, висмут-сульфит агар). Идентификацию культур сальмонелл проводили на основании результатов изучения морфологических, культуральных, биохимических свойств. Верификацию фенотипических свойств и антибиотикорезистентность проводили на автоматическом микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact 30 (BioMerieux). Для депонирования и хранения выделенных культур готовили LB-бульон с добавлением 15% глицерина. Культуры замораживали и хранили при -20°С.

***Молекулярно-генетическое исследование.*** Для выделения ДНК использовали 12-часовые культуры, предварительно стандартизированные согласно стандарту мутности, равному 4 единицам МакФарланда, что соответствует $12{,}6\times10^8$ КОЕ/мл. Экстракцию бактериальной ДНК проводили с использованием набора «ДНК-сорбБ» (АмплиСенс), в соответствии с инструкцией предлагаемой производителем. Для детекции ДНК нетифоидных Salmonella амплифицировали фрагмент гена omp размером 200 п.о., кодирующий белок наружной мембраны. Для амплификации последовательности *fljB* гена использовали режим 95°С — 5 мин, (95°С — 1 мин, 57°С — 1 мин, 72°С — 1 мин) — 25 циклов, 72°С — 10 мин. Температура отжига для амплификации последовательности *groEL* гена составляла 60°С — 1 мин.

***ПЦР-ПДРФ анализ генов groEL и fljB сальмонелл.*** Фрагменты гена *groEL* амплифицировали в ПЦР, подвергали обработке эндонуклеазой рестрикции *HaeIII* (сайт рестрикции GGCC). Фрагменты гена *fljB*, содержащие полиморфные участки, амплифицировали в ПЦР и подвергали обработке эндонуклеазой рестрикции *HhaI* (сайт рестрикции GCGC). Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

**Результаты и их обсуждение.** Для характеристики штаммов сальмонелл и подбора маркеров для последующих исследований был проведен ПЦР-ПДРФ анализ генов *fljB* и *groEL*, который позволил получить информацию о полиморфизме генов. Метод ПЦР-ПДРФ основан на способности эндонуклеаз рестрикции разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в специфичных участках с определенной нуклеотидной последовательностью с образованием фрагментов разной длины. Исчезновение или появление сайта рестрикции в результате точечной замены, могут быть обнаружены путем электрофоретического разделения фрагментов ДНК, образованных в результате действия эндонуклеаз рестрикции. ДНК-фрагменты, содержащие исследуемые последовательности генов фимбрий (*fljB*) и белка теплового шока (*groEL*), амплифицировали с помощью ПЦР. Для установления различий и выявления полиморфизма *groEL* гена был проведен ПЦР-ПДРФ анализ 50-ти штаммов *S. enterica*, представителей 5-ти серогрупп (таблица).

Специфичный фрагмент гена *groEL* размером 1600 п.о. был выявлен у всех исследованных штаммов сальмонелл. Для обнаружения точечных замен *groEL* гена ампликоны размером 1600 п.о. подвергали действию рестриктазы *HaeIII*. Для рестрикционного фермента *HaeIII* в последовательности гена *groEL* штаммов сальмонелл имелись по 2 или 3 сайта узнавания, формировались продукты 100, 200, 400 и 600 п.о. При обработке рестриктазой *HaeIII* ампликона 1600 п.о. гена *groEL* у изолятов было выявлено 2 рестрикционных профиля. Размеры фрагментов у культур с профилем 1 составляли 100, 400 и 600 п.о. В него вошли серотипы *Typhimurium, Enteritidis, London* принадлежащие серогруппам D1, B2 и E1, выделенные от разных источников инфекций. Размеры фрагментов у культур с профилем 2 составляли 100, 200, 400 и 600 п.о. В него вошли серотипы *Braenderup, Infantis, Munchen* и *Newport* (серогруппы C1 и C2). Рестрикционные профили изолятов различались на уровне серогрупп, отличий по источникам инфекции отмечено не было.

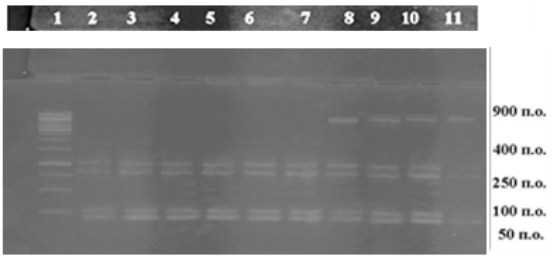
Таблица — Рестрикционный профиль продуктов ПЦР *groEL* гена сальмонелл

| *Salmonella* (серотип) | Серогруппа | Профиль ПЦР-ПДРФ ген *groEL*, *HaeIII* |
|---|---|---|
| *S. enteritidis* (n=20) | D1 | 1 |
| *S. tiphimurium* (n=15) | B2 | 1 |
| *S. infantis* (n=2) | C1 | 2 |
| *S. braenderup* (n=3) | C1 | 2 |
| *S. muenchen* (n=3) | C2 | 2 |
| *S. newport* (n=4) | C2 | 2 |
| *S. london* (n=3) | E1 | 1 |

Метод рестрикционного анализа гена *groEL* представляет возможность выявить полиморфизм, однако существуют ограничения в использовании для типирования, поскольку он позволил выявить различия на уровне серогрупп.

*Salmonella enterica* серовар *enteritidis* является одним из ведущих патогенов, передающихся через продукты питания (контаминированные яица и полуфабрикаты из птицы) [2, 3]. Генотипическое разнообразие генов флагеллина *fliC* и *fljB*, кодирующие фазы 1 и 2 сальмонелл, является биомаркером для типирования [6, 7]. Полиморфизм *fljB* гена выявляли с помощью ПЦР-ПДРФ. При регистрации данных электрофореза у 20-ти штаммов *S. enteritidis* был выявлен продукт гена *fljB* размером 1500 п.о., неоднородности амплифицируемого фрагмента гена отмечено не было. ПЦР-ПДРФ анализ гена *fljB* с использованием рестрикционного фермента *HhaI* позволил подразделить штаммы на 2 группы — А и Б (рисунок 1).

При обработке эндонуклеазой *HhaI* формировались новые продукты (50, 150, 250 и 400 п.о.). Высокая степень сходства отмечена у штаммов сформировавшим профиль Б, что позволяет сделать заключение об идентичности гена у сравниваемых штаммов. Предположительно, что 2 профиля рестрикции сформированы штаммами принадлежащим к двум клонам, поскольку штаммы выделены из одного источника инфекции (больные).




Дорожки: 1 — маркер молекулярных масс ДНК; 2–11 — ампликоны области гена fljB анализируемых образцов ДНК *S. enteritidis*; 2–7 — профиль А; 8–11 — профиль Б
Рисунок — Результаты ПЦР-ПДРФ анализа гена *fljB* эндонуклеазой рестрикции *HhaI*

Для изучения характеристик популяции сальмонелл использование фенотипических тестов (биотипирование, фаготипирование, изучение антигенной структуры и антибиотикорезистентности) является недостаточным и не позволяет оценить, степень родства сравниваемых штаммов. Проведение внутривидового типирования штаммов сальмонелл методом ПЦР-ПДРФ гена белка теплового шока (*groEL*) оказалось малоэффективным ввиду его высокой консервативности, однако позволяет выявить различия на уровне серогрупп. При типировании штаммов сальмонелл наибольшую дифференцирующую способность показал анализ гена флагеллина *fljB*. Подвижность сальмонелл является необходимым фактором в адаптации к условиям изменяющейся окружающей среды, в индукции воспалительного процесса, прикреплении к субстратам и образовании биопленок. ПЦР-ПДРФ анализ *fljB* гена сальмонелл позволяет дифференцировать изоляты внутри серогруппы и может быть адаптирован для практического применения как молекулярно-генетический метод типирования. Полиморфизм гена fljB может служить маркером для молекулярно-генетических исследований сальмонелл.

**Выводы.** Молекулярно-генетические методы позволяют устанавливать или исключать связь между отдельными случаями заболеваний, выявлять факторы передачи сальмонелл, дифференцировать эпидемические вспышки на фоне спорадической заболеваемости [2, 3, 9]. Получаемую информацию о эпидемиологически актуальных клонах сальмонелл, циркулирующих в данной области, можно сопоставлять с характеристикой клонов, выделенных ранее или на других территориях. Для получения возможности межлабораторного обмена данными и выявления вспышек кишечных инфекций необходимы молекулярно-генетические методы [8, 9]. В настоящее время в республике система эпидемиологического надзора за сальмонеллезной инфекцией ограничивается регистрацией случаев и бактериологическим исследованием материала от пациентов и объектов окружающей среды, что определяет необходимость введения в практику работы микробиологической лаборатории генетических методов типирования (ПЦР-ПДРФ, пульс-электрофореза).

**Литература**

1 Guerrant, R.L. Magnitude and impact of diarrheal diseases / R.L. Guerrant // Arch. Med. Res. — 2002. — Vol. 33. — P. 351–355.

2 Swaminathan, B. Foodborne disease trends and reports / B. Swaminathan // Foodborne Pathog. Dis. — 2005. — Vol. 2. — P. 285–286.

3 Pang, S. Genetic relationships of phage types and single nucleotide polymorphism typing of *Salmonella enterica* serovar typhimurium / S. Pang // J. Clin. Microbiol. — 2012. — Vol. 50, Is. 3. — P. 727–734.

4 Threlfall, E. J. Development and application of molecular typing methods for *Salmonella spp.* The U. K. experience / E.J. Threlfall // Med. J. Indonesia. — 1998 Suppl.1– P. 151–154.

5 Bell, R.L. Phylogenetic evaluation of the Typhimurium complex of *Salmonella* strains using a seven-gene multilocus sequence analysis / R.L. Bell // Infect. Genet. Evol. — 2011. — Vol. 11, Is. 1. — P. 83–91.

6 Aldridge, P. Transcriptional and translational control of the *Salmonella fliC* gene / P. Aldridge // J. Bacteriol. — 2006. — Vol. 188. — P. 4487–4496.

7 Barker, C.S. *FliO* regulation of *FliP* in the formation of the *Salmonella enterica* flagellum / C.S. Barker // PloS. Genet. — 2010. — Vol. 6, № 9. — P. e1001143.

8 Typing of *Salmonella enterica* Serotype Paratyphi C isolates from various countries by plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis / S. Kariuki [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. – Vol. 37. – P. 2058–2060.

9 Didelot, X. Recombination and population structure in Salmonella enterica / X. Didelot // PLoS Genet. — 2011. — Vol. 7. — P. el002191.

## MOLECULAR AND GENETIC TIPIROVANIYE OF CLINICAL ISOLATES OF SALMONELLAS AS AN IMPORTANT ELEMENT OF AN EPIDNADZOR BEHIND CLINICAL INFECTIONS

**Nosova E.S., Titov L.P.**

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

For *S. enterica* typing held PCR-RFLP method of the flagellin gene (fljB) and heat shock protein (groEL). The results of the present study identified a polymorphism of studied genes, suggesting the molecular typing S. enteritidis strains by fljB gene allows to differentiate isolates within the serogroup.

**Keywords:** salmonella, typing, PCR-RFLP, polymorphism, flagellin genes.

Поступила 06.09.2013

## ЭЛАСТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА И СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

**Окулич В.К., Прудников А.Р., Корнилов А.В., Клименкова Ю.Г., Мацкевич Е.А.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** Разработана методика определения способности микроорганизмов синтезировать эластазу. Изучена способность штаммов золотистого стафилококка и синегнойной палочки к синтезу данного фермента. Установлена способность всех штаммов синегнойной палочки и большей части стафилококков продуцировать эластазу, что можно использовать для идентификации данных микроорганизмов в микробиологических лабораториях.

**Ключевые слова:** эластаза, микроорганизмы.

**Введение.** В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов. Большинство гидролаз являются экзоферментами, которые, выделяясь в окружающую среду, расщепляют крупные молекулы до мономеров и димеров, способных проникнуть внутрь клетки и обеспечивают ее источниками углерода и энергии. Также экзоферменты являются факторами агрессии и инвазии и помогают микроорганизмам преодолевать защитные барьеры макроорганизма. Одним из таких факторов является фермент эластаза. Она участвует в деградации матриксных белков — эластина, коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов. Кроме того, эластаза расщепляет многие растворимые протеины - иммуноглобулины, факторы коагуляции, компоненты комплемента и многие протеазные ингибиторы [1].

Весьма важным представляется значение данного фермента как регулятора воспаления, причем в разных ситуациях она может выступать и как провоспалительный, и как противовоспалительный агент. Известна протеолитическая активность эластазы в отношении многих растворимых протеинов, в т. ч. цитокинов воспаления. Описана ее способность in vitro блокировать 1-й и 3-й рецепторы комплемента, что снижает миграцию Т-лимфоцитов и нейтрофилов в очаг воспаления, подавляет их адгезивные свойства. Эластаза расщепляет рецепторы липополисахаридов (ЛПС) CD14, что приводит к уменьшению экспрессии IL-8 и TNFα в ответ на стимуляцию ЛПС. Как известно, ЛПС являются главными компонентами бактериальной стенки. Таким образом, этот фермент снижает воспалительный ответ на внедрение микроорганизмов. Противоположным противовоспалительным эффектом является ее способность усиливать воспалительные реакции. Описано индуцирующее влияние на продукцию IL-6, IL-8, колониестимулирующего фактора [2].

Таким образом, особенности патогенеза заболеваний, вызванных различными микроорганизмами, частично определяются их ферментативный спектром, который является таксономическим признаком, что в свою очередь помогает в идентификации бактерий. Например, не все микроорганизмы могут синтезировать эластазу, и только некоторые штаммы синегнойной палочки (IFO 3455, TM13, TM14, TM 49, TM 97) способны на это [3].

Для своевременного назначения лечения и определения комплекса противоэпидемических мероприятий, необходимо в максимально короткие сроки поставить этиологический диагноз и определить факторы патогенности. Внедрение в практику современных методов идентификации бактерий, позволяет в какой-то мере разрешить существующую проблему.

**Цель:** разработать метод определения эластазной активности микроорганизмов и апробировать его на клинических изолятах синегнойной палочки и золотистого стафилококка.

**Материалы и методы.** Исследована эластазная активность 24 штаммов микроорганизмов, из которых 6 штаммов были *Staphylococcus aureus* и 18 — *Pseudomonas aeruginosa*.

Штаммы микроорганизмов были получены от пациентов, находившихся на лечении в ожоговом, гнойном хирургическом отделениях и РАО на базе Витебской областной клинической больницы.

Патологический материал забирался из гнойного очага ватным тампоном. Тампон в дальнейшем помещался в стерильную пробирку. Для выделения стафилококков применяли высокоселективный желточно-солевой агар с азидом натрия. При выделении бактерий псевдомонад — среду ЦПХ с N-цетилпиридиния хлоридом.

Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе ATB Expression фирмы «bioMerieux». Для идентификации микроорганизмов использовали выделенную чистую культуру. Материалом служили изолированные колонии на чашке или чистые культуры в пробирке. Из них готовили суспензию в концентрации стандарта оптической плотности. Далее раствор суспензии вносили в лунки со средами данной тест-системы и следовали инструкции по применению.

При идентификации использовались стрипы: ID 32 STAPH — для стафилококков, ID 32 GN — для псевдомонад. Исследования проводили в соответствии с прилагаемыми к тест-системам инструкциями.

Расчет показатели средней величины (M) и стандартного отклонения (σ) производился при помощи программы Statgraph 2.0.

**Результаты и их обсуждение.** Ранее нами была разработана методика определения эластазной активности биологических жидкостей [4].

В качестве субстрата использовался эластин-Конго красный. Эластаза расщепляла эластин, и конго-красный переходил в раствор, изменяя его цвет с бесцветного на красный с максимальным спектром поглощения при длине волны 495 нм (рисунок 1).

Рисунок 1 — Снимок частиц эластазы до и после инкубации, полученный на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE

Разработанная ранее нами методика не позволяла определять способность бактерий к синтезу эластазы, т. к. при переходе Конго красного в раствор рост и синтез ферментов микроорганизмами прекращался. Поэтому процессы синтеза эластазы бактериями и взаимодействие эластазы с субстратом были разделены:

1. На первом этапе производился посев культуры, выделенной от пациентов с панкреатитом, на скошенный агар.

2. Посев культуры на среду Мюллер–Хинтона содержащую 2% желатина. Данный субстрат был выбран из-за его доступности. При этом активировался адаптивный синтез эластазы микробами.

3. После инкубации 400 мкл жидкости, содержащей микроорганизмы и продуцированную ими эластазу, перемещали в эппендорфы и центрифугировали 1 тыс. об/мин в течение 10 мин.

5. В эппендорфы вносили последовательно: 400 мкл раствора эластин-Конго красного в концентрации 0,8 мг на 1 мл на трис-HClбуфера (С=0,2М) с pH 7,4 и 100 мкл надосадочной жидкости. Контрольные пробы, содержали 400 мкл буферного раствора с pH 7,4 и 100 мкл надосадочной жидкости.

6. Инкубацию проб поводили в термостате при t=37°С в течение 24 ч.

7. После инкубации пробы извлекали из термостата и центрифугировали.

8. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96 луночного полистиролового планшета.

9. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм (максимально близкой к 495) определяли оптическую плотность раствора в лунках.

Промежуточный результат выражался в оптических единицах и рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета полученных результатов в пикокаталы нами была использована формула, выведенная после построения калибровочного графика по разведенному Конго красному, в котором была отражена зависимость активности фермента от оптической плотности раствора, исходя из того, что при расщеплении 1 молекулы субстрата, в раствор переходит 1 молекула Конго красного:

$$Y= [-0,00117+0,0346\times Eоп]\times 9,92,$$

где Y — искомый результат;

Еоп — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

При помощи данной методики была исследована эластазная активность 24 штаммов микроорганизмов, из которых 6 штаммов были *Staphylococcus aureus* и 18 — *Pseudomonas aeruginosa*.

Установлено, что все штаммы золотистого стафилококка обладали эластазной активностью, а у синегнойной палочки из 18 штаммов данная активность присутствовала только у 14 изолятов (78%).

Эластазная активность у штаммов синегнойной палочки составила 0,027±0,03 пкат, а у штаммов золотистого стафилококка 0,041±0,02 пкат (рисунок 3).

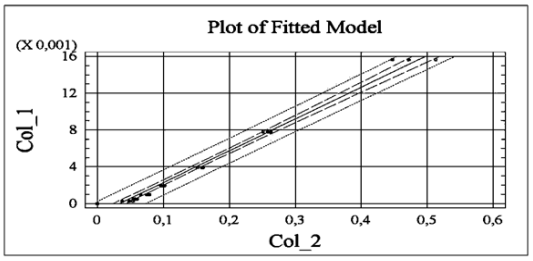



Рисунок 2 — Калибровочный график для определения эластазной активности

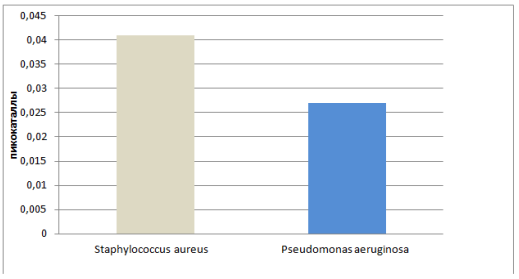



Рисунок 3 — Эластазная активность различных микроорганизмов

**Выводы:**

1. Разработана методика определения эластазной активности микроорганизмов.

2. Установлено, что все штаммы золотистого стафилококка и 78% штаммов синегнойной палочки обладают эластазной активностью со средними значениями 0,041±0,02 пкат и 0,027±0,03 пкат соответственно.

**Литература**

1. Супотницкий, М. Микроорганизмы, токсины и эпидемии / М. Супотницкий. — М.: Вуз. книга, 2000. — 376 с.

2. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких // Цитокины и воспаление [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.cytokines.ru/2007/4/Art1.php. — Дата доступа: 12.08.2013.

3. Morihara, K. Production of protease and elastase by Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients / K. Morihara, H. Tsuzuki // Infect. Immunity. — 1977. — Vol. 15, № 3. — P. 679–685.

4. Методика определения активности эластазы в биологических жидкостях: инструкция на метод; рег. № 66 / А.В. Корнилов, Ю.Г. Савкина, В.К. Окулич. — Витебск, 2011.

## ACTIVITY OF ELASTASE OF STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM PATIENTS WITH SURGICAL INFECTION

**Okulich V.K., Prudnikau A.R., Karnilau A.V., Klimenkova Y.G., Matskevich E.A.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

We developed the technique of determining the ability of microorganisms to synthesize elastase. We studied the ability of strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to the synthesis of the enzyme. Installed capacity of all strains of Pseudomonas aeruginosa and most of staphylococci produce elastase, which can be used for identification of these microorganisms in microbiological laboratories.

**Keywords:** elastase, microorganisms

Поступила 02.09.2013

## СТУПЕНЧАТАЯ ДИЕТОТЕРАПИЯ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ

**Плоскирева А.А.**

*ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия*

**Резюме.** В статье на основе собственных данных и проведённого мета-анализа изложены основные подходы ступенчатой диетотерапии при острых кишечных инфекциях у детей на основе этапности организации нутритивной поддержки пациентов в зависимости от возраста, тяжести заболевания и стадии заболевания.

**Ключевые слова:** острые кишечные инфекции, ступенчатая диетотерапия.

Острые кишечные инфекции до настоящего времени продолжают занимать одно из ведущих мест в структуре инфекционной патологии у детей, особенно раннего возраста. Нарушения питания у детей при острых кишечных инфекциях развиваются с самого начала заболевания и связаны как с течением инфекционного процесса, так и с изменением метаболизма, вызванного заболеванием.

При острых кишечных инфекциях у детей развивается стандартная адаптационная реакция срочного типа, которая проявляется напряжением всех защитных и гомеостатических функций организма, развитием дефицита функционального и пластического резерва, независимо от этиологии заболевания развитием стереотипного метаболического ответа, существенных изменений функций многих органов и систем и изменением обменных процессов в организме [1].

Особенностью метаболических нарушений при острых кишечных инфекциях у детей является быстрое истощение запасов гликогена в первые сутки заболевания с последующей перестройкой обмена веществ в сторону глюконеогенеза. Это сопровождается развитием процессов катаболизма структурных белков, повышением уровня кетоновых антител и активацией перекисного-окислениия липидов, что усугубляет интоксикационный синдром у данной категории пациентов. Особенностью метаболического ответа в данной ситуации является отсутствие влияния вводимой извне глюкозы на процессы глюконеогенеза, а, следовательно, и на катаболизм мышечной ткани [2].

Энтеральное питание является необходимым компонентом тактики ведения пациентов даже с тяжёлыми формами острых кишечных инфекций, так как поступающие питательные вещества влияют на нутритивный статус больного ребёнка, состояние его иммунобиологической реактивности, обладают энетропротекцией, способствуют поддержанию микрофлоры кишечника и функций всех органов и систем. Неправильная организация питания приводит к снижению адаптационного потенциала и иммунологических свойств организма.

Несмотря на выраженные нарушения нутритивного статуса, развивающиеся при острых кишечных инфекциях у детей, анорексию, рвоту, диарейный синдром, 80–90% углеводов, 70% жиров, 75% белков из поступающего питания усваиваются [3]. Однако особенности течения инфекционного процесса, развития адаптационных реакций и нутритивного статуса при острых кишечных инфекциях у детей требуют от врача особой тактики организации диетотерапии с учетом возраста, формы и сроков заболевания.

Основные принципы лечебного питания при инфекционных заболеваниях, в частности при острых кишечных инфекциях, были разработаны М.И. Певзнером еще в 1927 г. [4].

В настоящее время общепризнанным является обязательное продолжение энтерального питания при острых кишечных инфекциях у детей и доказано, что «водно-чайные» паузы и голодные диеты значительно ослабляют защитные функции организма и приводят к задержке репаративных процессов в кишечнике [3,5].

В литературе подробно рассмотрены вопросы диетотерапии острых кишечных инфекций у детей первого года жизни. Показана роль грудного вскармливания, а у детей, находящихся на искусственном вскармливании — адаптированного питания [3, 6 – 8, 22].

Широко освещена роль продуктов функционального питания и смесей для питания детей первого года жизни, содержащих пробиотики, как в остром периоде заболевания, так и в реабилитации пациентов, перенесших острые кишечные инфекции [9 – 13].

По данным клинико-лабораторного изучения частоты лактазной недостаточности у детей первых 3-х лет жизни, больных острыми кишечными инфекциями, ее симптомы выявляются в 91,4% случаев [14]. Поэтому особое место в диетотерапии острых кишечных инфекций у детей занимает коррекция данной ферментопатии [15–18].

Вопросы диетотерапии при острых кишечных инфекциях у детей старше года в литературе представлены несколько меньше [20, 21]. При тяжелых острых кишечных инфекциях показана роль энтерального питания на основе специализированных продуктов лечебного питания [16, 19].

Однако достижения клинической диетологии в педиатрии описывают нутритивные подходы для определённых групп пациентов, больных острыми кишечными инфекциями, и в настоящее время одной из насущных проблем является создание единой системы организации диетотерапии при данной патологии, учитывающей возраст пациента, выраженность метаболических нарушений, стадию и тяжесть заболевания.

Нами разработана схема ступенчатой диетотерапии, подразумевающая этапность тактики организации нутритивной поддержки в зависимости от возраста, стадии заболевания и формы тяжести.

Общим для пациентов всех возрастных групп является своевременность начала диетотерапии, которая должна начинаться с первых суток заболевания ребёнка и продолжаться до нормализации метаболического статуса и достижения положительной динамики состояния. Питание при этом должно быть адекватным для каждого из этапов и сбалансированным по составу макро- и микронутриентов.

В разработанную схему ступенчатой диетотетрапии входят три основных этапа, для каждого из которых патогенетически обоснованным является определенная ступень диетотерапии. Каждый из этапов диетотерапии определяются клинической картиной, морфологическими и функциональными изменениями, вызванными инфекционным процессом, а так же тяжестью заболевания и возрастом ребенка. Первый этап организации ступенчатой диетотерапии соответствует острому периоду заболевания, второй этап — периоду репарации, третий — периоду реконвалесценции.

Острый период заболевания относится к первому этапу организации ступенчатой диетотерапии. Отличительной особенностью данного периода является наличие выраженной клинической симптоматики, дисбаланса нутритивного статуса, значительных морфофункциональных изменений в организме ребенка, связанных с наличием повреждающего фактора (возбудителя острой кишечной инфекции). При выборе тактики диетотерапии на данном этапе необходимо обеспечить оптимальный состав питания (в частности, по белковому компоненту, так как дополнительное введения белка несмотря на выраженные процессы катаболизма в остром периоде заболевания, не несёт каких-либо преимуществ, а приводит к возрастанию метаболической нагрузки), поддержание энергетических затрат организма, а также осуществление энтеросорбции (традиционно широко используемое ранее назначение рисового отвара, пектинсодержащих продуктов).

В соответствии с предлагаемой схемой ступенчатой диетотерапии для пациентов первого года жизни, находящихся на искусственном вскармливании (схема 1), на первом этапе в зависимости от тяжести заболевания рекомендованы различные виды нутритивной поддержки. Так, пациентам с тяжелыми формами болезни показано энтеральное питание специализированными смесями на основе высокогидролизованного молочного белка, (например, «Альфаре»), которые доказали свою эффективность в различных клинических исследованиях [3, 22, 23]. Длительность такого питания должна продолжаться до восстановления основных показателей гомеостаза, уменьшения выраженности

клинических проявлений острой кишечной инфекции (исчезновение рвоты, анорексии, уменьшение частоты стула, улучшение его характера, появление аппетита).

У детей первого года жизни, больных острыми кишечными инфекциями средней тяжести и находящихся на искусственном вскармливании, в соответствии со схемой ступенчатой диетотерапии показаны кисломолочные продукты, предназначенные для данного возраста [3, 16, 22]. В случае развития лактазной недостаточности рекомендованы низко- и безлактоктозные смеси для детей соответсвующего возраста, которые имеют несомненное преимущество в купировании данной ферментопатии у детей первого года жизни, больных острыми кишечными инфекциями по сравнению с другими методами нутритивной поддержки [3, 14].

В случае развития у пациента легкой формы заболевания на данном этапе основным компонентом ступенчатой диетотерапии должны быть продукты функционального питания, содержащие пробиотики и предназначенные для питания детей первого года жизни. Терапевтические эффекты пробиотиков, входящих в состав продуктов питания, связаны с поддержанием колонизационной резистентности в первую очередь в биотопе слизистой оболочки кишечника, иммуномодулирующим действием, участием в обмене веществ, дезинтоксикации и других процессах [24].

На первом этапе ступенчатой диетотерапии у детей старше года выбор тактики организации питания так же определяется тяжестью заболевания (схема 2).

У больных тяжёлыми формами острых кишечных инфекций доказали свою эффективность в клинических исследованиях продукты лечебного энтерального питания (в частности «Клинутрен Юниор») [16, 19]. Продукт клинического питания, используемый для диетотерапии у больных тяжёлыми формами острых кишечных инфекций, должен с одной стороны обеспечивать возросшие потребности организма больного ребёнка, а с другой стороны на фоне инфекционного повреждения слизистой оболочки кишечника не повышать осмолярность кишечного содержимого, иметь оптимальный белковый состав (увеличение доли сывороточных белков), не содержать лактозу. Ранее данные продукты энтерального питания широко использовались у пациентов с тяжелыми воспалительными заболеваниями кишечника (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона), а так же при хирургических вмешательствах. В настоящее время проведённые клинические исследования позволяют расширить их место в диетотерапии за счёт применения при тяжелых формах острых кишечных инфекций [19].

Схема 1 — Ступенчатая диетотерапия острых кишечных инфекций у детей первого года жизни, находящихся на искусственном вскармливании

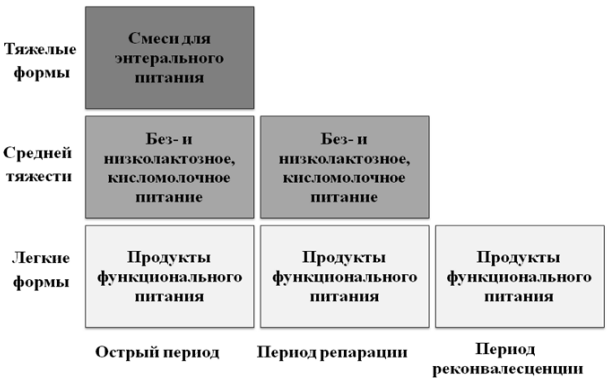



Схема 2 — Ступенчатая диетотерапия острых кишечных инфекций у детей старше 1 года

У детей старше года, больных острыми кишечными инфекциями средней тяжести, большинством авторов рекомендовано исключение из рациона цельного молока и показано назначение в качестве диетотерапии кисломолочных продуктов [3]. Благоприятные свойства данных продуктов при острых кишечных инфекциях обусловлены целым рядом факторов, в частности, наличие молочной кислоты придает продукту выраженные бактерицидные свойства за счет подавления роста патогенной и потенцирования нормальной микрофлоры. Помимо этого для кисломолочных продуктов доказано положительное влияние на микробиоценоз кишечника, секреторную функцию пищеварительных

желез и перистальтику кишечника, а так же они обладают иммуномодулирующими свойствами [23].

Одним из важных компонентов ступенчатой диетотерапии у данной категории пациентов является использование безмолочных каш с про- и синбиотиками. В клинических исследованиях показано, что назначение данной диетотерапии способствует более быстрому купированию основных симптомов кишечной дисфункции, а также восстановлению микробиоценоза кишечника [21].

Для больных легкими формами острых кишечных инфекций старшего возраста согласно предлагаемой схеме ступенчатой диетотерапии на первом этапе так же, как и детям в возрасте до года показано назначение в качестве нутритивной поддержки продуктов функционального питания с пробиотиками (схема 2).

Второй этап — период репарации — характеризуется уменьшением или исчезновением основных клинических проявлений острой кишечной инфекции. Состояние пациента улучшается, ребенок становится активным, улучшается аппетит, а у некоторых пациентов он даже становиться повышенным, что нередко родители воспринимают как сигнал к «усиленному» питанию. Однако морфологические и/или функциональные изменения в организме пациента ещё сохраняются, соответственно диетотерапия в этот период должна быть продолжена. Этот период так же важен и прогностически, так как нарушение диеты может привести формированию гастроэнтерологической патологии (поджелудочной железы, желчевыводящих путей и других органов). При выборе тактики диетотерапии на данном этапе необходимо обеспечить поддержание репаративных процессов в кишечнике, постепенное включение нарушенных функций поджелудочной железы, желчеотделения, а так же восстановление микробиоценоза желудочно-кишечного тракта.

В соответствии со схемой ступенчатой диетотерапии в период репарации назначение схемы нутритивной поддержки осуществляется индивидуально, в зависимости от того, как протекал острый период заболевания. Так, у пациентов, больных тяжёлыми формами острых кишечных инфекций, в периоде репарации показано назначение кисломолочных, без- и низколактозных продуктов в соответствии с возрастом. Больным первого года жизни, перенесшим острые кишечные инфекции лёгкой и средней тяжести, на втором этапе диетотерапии рекомендованы смеси с пробиотиками, а детям более старшего возраста — пробиотические продукты (схемы 1 и 2).

Третий этап — период реконвалесцинции. Основным подходом в диетотерапии острых кишечных инфекций у детей на данном этапе является постепенное расширение диеты в соответствии с возрастом ребёнка и широкое использование пробиотических продуктов питания с целью восстановления и поддержания функции желудочно-кишечного тракта и его микробиоценоза.

Таким образом, приведённая схема ступенчатой диетотерапии позволяет унифицировать для практического врача подход к нутритивной поддержке при острых кишечных инфекциях у детей, с учетом возраста, тяжести и стадии заболевания.

**Литература**

1. Боткина, А.С. Современные аспекты нутритивной поддержки / А.С. Боткина // Трудный пациент. - 2008. — № 9. — С. 44–49.

2. Agus, M.S.D. Nutritional support of the critically ill child / M.S.D. Agus, T. Jaksic // Curr. Opin. Pediatr. — 2002. — Vol. 14. — P. 470–481.

3. Горелов, А.В. Лечение острых кишечных инфекций у детей: пособие для врачей / А.В. Горелов, Л.Н. Милютина, Д.В. Усенко. — М.: ЦНИИ Эпидемиологии, 2003. — 48 с.

4. Певзнер, М.И. Основы лечебного питания / М.И. Певзнер. — 3 изд-е. — М.: Медгиз, 1943.

5. Горелов, А.В. Комплексная терапия острых кишечных инфекций у детей / А.В. Горелов, Д.В. Усенко, Л.И. Елезова // Леч. врач. — 2008. — № 4. — С. 94–95.

6. Вирусные диареи у детей: особенности клинической картины и тактика диетической коррекции / О.В. Тихомирова [и др.] // Вопр. совр. педиатрии. — 2009. — Т. 8, № 1. — С. 98–103.

7. Мартынова, Г.П. Роль диетотерапии при лечении кишечных инфекций у детей / Г.П. Мартынова, Я.А. Богвилене, М.Л. Меньшикова // Вопр. совр. педиатрии. — 2006. — № 5. — С. 367.

8. Особенности диетотерапии при острых кишечных инфекциях у детей грудного возраста / Р.Г. Ловердо [и др.] // Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского. — 2004. — № 1. — С. 75–78.

9. Fedorak, R.N. Probiotics in the treatment of gastrointestinal diseases / R.N. Fedorak // US Gastroenterol. Rev. — 2006. — P. 28–31.

10. Горелов, А.В. Пробиотики: механизмы действия и эффективность при инфекциях желудочно-кишечного тракта / А.В. Горелов, Д.В. Усенко // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2006. — № 4. — С. 53–57.

11. The effect of supplementation with milk fermented by Lactobacillus casei (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres / C.A. Pedone [et al.] // Int. J. Clin. Prac. — 1999. — Vol. 53, № 3. — P. 179–184.

12. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhea / M. Kaila [et al.] // Arch. Dis. Child. — 1995. — Vol. 72. — P. 51–53.
13. Fedorak, R.N. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders / R.N. Fedorak, K.L. Madsen // Curr. Opin. Gastroenterol. — 2004. — Vol. 20. — P. 146–155.
14. Антоненко, А.Н. Лактазная недостаточность у детей раннего возраста, больных острыми кишечными инфекциями, основные методы ее коррекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Н. Антоненко. — М., 2006. — 17 с.
15. Lactose intolerance among severely malnourished children with diarrhoea admitted to the nutrition unit, Mulago hospital, Uganda / R. Nyeko [et al.] // BMC Pediatr. — 2010. — Vol. 10. — P. 31.
16. Усенко, Д.В. А.В. Лактазная недостаточность у детей / Д.В. Усенко, А.В. Горелов // Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского. — 2009. — № 1. — С. 33.
17. Chouraqui, J.P. Feeding infants and young children with acute diarrhea / J.P. Chouraqui, A.P. Michard-Lenoir // Arch. Pediatr. — 2007. — Vol. 14, Suppl 3. — P. 176–180.
18. Kukuruzovic, R.H. Milk formulas in acute gastroenteritis and malnutrition: a randomized trial / R.H. Kukuruzovic, D.R. Brewster // J. Paediatr Child Health.— 2002. — Vol. 38, № 6. — P. 571–577.
19. Новый метод оптимизации энтерального питания у детей с острыми кишечными инфекциями / Л.В. Феклисова [и др.] // Леч. врач. — 2008. — № 9. — С. 65–67.
20. Хаертынов, Х.С. Современные принципы терапии острых кишечных инфекций у детей раннего возраста / Х.С. Хаертынов, В.А. Анохин // Казан. мед. жур. — 2010. — Т. 91, № 1. — С. 1–6.
21. Роль функционального питания в коррекции диарейного синдрома у детей раннего возраста с острыми кишечными инфекциями / Р.Г. Ловердо [и др.] // Вопр. детской диетологии. — 2009. — Т. 7, № 3. — С. 66–69.
22. Плоскирева, А.А. Клинико-лабораторная эффективность различных видов вскармливания у детей первого года жизни, больных острыми кишечными инфекциями: дис. ... канд. мед. наук / А.А. Плоскирева. — М., 2003. — 172 с.
23. Мазанкова, Л.Н. Лечебное питание при острых кишечных инфекциях у детей / Л.Н. Мазанкова, Н.О. Ильина, Л.В. Бегиашвили // Леч. врач. — 2009. — № 2. — С. 56–59.
24. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров. — Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. — М.: ГРАНТЪ, 2001. — 286 с.

## THE STEPPED DIET IN ACUTE INTESTINAL INFECTIONS IN CHILDREN

**Ploskireva A.A.**

*Federal Budgetary Research Institution, Central Research Institute of Epidemiology of the Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service (Rospoterbnadzor), Moscow, Russia*

The article describes the main principles of stepped diet therapy of acute intestinal infections in children developed on the basis of nutritive support staging, depending on patients' age, stage and severity of disease. Significance of functional food products for diet therapy tactics in patients with mild and moderately severe forms of infection is demonstrated.

**Keywords:** acute intestinal infections, steppped diet therapy.

Поступила 04.09.2013

## ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ЕЕ СВЯЗЬ С ФОРМИРОВАНИЕМ БИОПЛЕНКИ

**Плотников Ф.В., Окулич В.К., Кабанова А.А.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** В настоящее время большинством исследователей в области микробиологии признано, что абсолютное множество микроорганизмов существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ — биопленок. В составе биопленки бактерии обладают повышенной устойчивостью к воздействию антибиотиков, успешно противостоят антителам, фагоцитам и другим потенциально опасным для них факторам окружающей среды. В ходе проведения исследования разработаны методы, которые позволяют оценить формирование бактериями биопленки in vitro в кратчайшие сроки с наименьшими затратами. Не было обнаружено значимой корреляционной связи между чувствительностью микроорганизмов к антибактериальным препаратам и их спо-

собностью формировать биопленки, что может указывать на сложные механизмы защиты микроорганизмов к биоцидам.

**Ключевые слова:** биопленка, бактерия, антибиотикорезистентность.

**Введение.** Особенности клинической картины хирургической инфекции на современном этапе проявляются в увеличении числа тяжело протекающих и неподдающихся стандартному лечению осложненных форм гнойно-воспалительных заболеваний, учащении случаев атипичного длительного течения заболевания. Недостаточная эффективность проводимого лечения хирургической инфекции в определенной мере объясняется наличием у микроорганизмов действенных механизмов защиты от внешних повреждающих факторов. Последнее десятилетие ознаменовалось формированием новых представлений об организации жизни бактерий, особенностей их существования во внешней среде и организме человека. До конца прошлого века микробиология развивалась на основе исследований чистых культур микроорганизмов. Традиционный путь культивирования бактерий в жидкой среде способствовал изучению бактерий и прояснил многие аспекты физиологии микроорганизмов, однако рост чистой культуры во взвешенном состоянии встречается в природе крайне редко. В настоящее время основной частью микробиологов признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ — биопленок [1]. Общая теория преобладания биопленок микроорганизмов над их свободноживущими формами была сформулирована в 1978 г. [3]. Согласно этой теории, бактерии основную часть времени развития и размножения находятся в матриксе биопленки, прикрепленной к поверхностям богатых питательными веществами экосистем, и эти прикрепленные клетки физиологически отличны от клеток того же штамма, взвешенных в среде [4]. Планктонную стадию можно рассматривать как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, т. е. кратковременное состояние в жизни бактерий. Биопленка — микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов [2].

**Цель.** Изучить чувствительность *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам и ее связь со способностью данного микроорганизма формировать биопленки.

**Материалы и методы.** Изучены 62 клинических изолята *Pseudomonas aeruginosa*, полученных из микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии». Забор микробиологического материала производился в ожоговом, реанимационном отделении и в отделении гнойной хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница» в течение сентября–декабря 2011 г. На базе микробиологической лаборатории центра «Инфекция в хирургии» производилось определение чувствительности выделенных штаммов к антибактериальным препаратам на биохимическом анализаторе ATB Expression фирмы «bioMerieux»; методами стандартных бумажных дисков и серийных разведении на плотной питательной среде. Изучение способности штамма образовывать биопленку осуществляли по разработанной нами методике. Штамм бактерий выращивали на агаре при 37°С в течение 24 ч. В асептических условиях с помощью бактериологической петли готовили взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера–Хинтона с оптической плотностью на денситометре 0,5 ед., что соответствует конечной концентрации $1{,}5\times10^8$ КОЕ/мл. В лунки планшета вносили по 150 мкл полученной взвеси бактерий, на один штамм отводили 8 лунок. Отрицательным контролем служили лунки с 150 мкл бульона Мюллера–Хинтона без бактерий. Планшет инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24 ч. Из лунок с помощью стерильной пипетки удаляли содержимое. Лунки промывали четырехкратно дистиллированной водой с помощью автоматической мойки МВ-350 производства «Технофорум». Биопленку фиксировали путем добавления в лунки по 160 мкл 2,5% раствора глютаральдегида и его инкубации в течение 5 мин. Планшет четырехкратно промывали и вносили по 170 мкл 0,25% раствора кристаллического фиолетового на 5 мин, после чего снова повторяли процедуру отмывки четыре раза и высушивали в течение 10 мин. В лунки добавляли по 200 мкл 33% раствора уксусной кислоты и инкубировали при комнатной температуре 10 мин до полной экстракции кристаллического фиолетового в кислоту. Для измерения планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 620 нм определяли оптическую плотность в лунках. По полученным данным определяли среднее

значение 8 лунок и оценивали способность образования микроорганизмом биопленки *in vitro*. При значении оптической плотности до 0,12 оптических единиц определяли отсутствие способности образовывать биопленки, при 0,12–0,24 — среднюю, при более 0,24 — сильную способность к образованию биопленки. Статистическую обработку данных производили с помощью Excel и Statistica 6.0. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического метода Спирмена. Значение коэффициента корреляции r=0,7–0,99 принимали за указание на сильную связь, r=0,3–0,69 — на связь средней силы, r=0–0,29 — на слабую связь.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе исследования выявлено, что штаммы *Pseudomonas aeruginosa* обладают наибольшей чувствительностью к имипенему (54% выделенных штаммов), при этом устойчивость к данному антибиотику определялась в 36%. К цефтазидиму выявлена чувствительность в 39% случаев, устойчивость — в 54%; камикацину чувствительными были 16% выделенных штаммов, устойчивы —80%. К меропенему оказались чувствительны 15% выделенных и 83% устойчивы к нему. К левофлоксацину чувствительны 10%, а устойчивы 90% штаммов. Чувствительность и резистентность к офлоксацину, соответственно, составила 2 и 98%, к цефепиму — 3 и 97%. Полученные данные приведены в таблице 1.

При изучении способности штаммов к образованию биопленки *in vitro* выявлено, что не образуют биопленку 17 штаммов (27%), слабо образуют — 25 (40%), а сильную способность к формированию биопленок проявляют 20 штаммов (33%).

При корреляционнov анализt выявлена слабая связь между способностью штаммов образовывать биопленку и их чувствительностью к антибактериальным препаратам (таблица 2).

Таблица 1 — Чувствительность штаммов *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам

| | Амикацин | Офлоксацин | Левофлоксацин | Цефтазидин | Цефепим | Имипенем | Меропенем |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Всего исследованных штаммов | 61 | 43 | 19 | 59 | 61 | 61 | 47 |
| Чувствительность (S) | 10 (16%) | 1 (2%) | 2 (10%) | 23 (39%) | 2 (3%) | 33 (54%) | 7 (15%) |
| Резистентность (R) | 49 (80%) | 42 (98%) | 17 (90%) | 32 (54%) | 59 (97%) | 22 (36%) | 39 (83%) |
| Умеренная чувствительность (S/R) | 2 (4%) | 0 | 0 | 4 (7%) | 0 | 6 (10%) | 1 (2%) |

Таблица 2 — Корреляция способности формировать биопленки и чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (r)

| | Амикацин | Офлоксацин | Левофлоксацин | Цефтазидин | Цефепим | Имипенем | Меропенем |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Способность образовывать биопленку | 0,205 | 0,191 | 0,0000001 | 0,160 | -0,005 | 0,131 | 0,127 |

**Выводы.** Таким образом, можно заключить, что наибольшей чувствительностью штаммы *Pseudomonas aeruginosa* обладают к имипенему, а наибольшая устойчивость выявлена к офлоксацину и цефепиму. При этом большая часть выделенных клинических изолятов способна образовывать биопленку в той или иной степени. Однако на данном объеме исследования выявить значимую корреляционную связь между чувствительностью микроорганизмов к антибактериальным препаратам и их способностью формировать биопленки не представилось возможным, что вероятно указывает на наличие сложных механизмов защиты бактерий от антимикробных факторов.

**Литература**

1. Davey, M.E. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Microbiol. Mol. Biol. Rev. Dec. — 2000. — Vol. 64, № 4. — P. 847–867.

2. Donlan,R.M. Biofilms: Survival Mechanismsof Clinically Relevant Microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. — 2002. — Vol. 15, № 2. — P. 167–193.
3. How bacteria stick / J.W. Costerton [et al.] // Sci. Am. — 1978. — № 238. — P. 86–95.
4. Microbial biofilms / J.W. Costerton [et al.] // Ann. Rev. Microbiol. — 1995. — № 49. — P. 711–745.

## INVESTIGATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS AND ITS RELATION TO BIOFILM FORMATION

**Plotnikov P.V., Okulich V.K., Kabanova A.A.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

The ability of a microorganism to establish an infection depends on a number of factors which include those of the host and the pathogen. Pathogenic effects on the host are often times affected by the organism's ability to secrete protective shields such as extracellular polysaccharides (EPS) and biofilm. Biofilm is a complex, heterogeneous and integrated community of surface attached microorganisms of either single or multiple species that are encased within the extracellular polymeric matrix produced by them. Stains such as Violet can be used to stain cells in fixed biofilm. These stain technique expands the possibilities for biofilm investigation.

**Keywords:** biofilm, bacteria, antibiotic resistance.

Поступила 06.09.2013

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ТОЛЕРОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ

**Романова И.В., Гончаров А.Е., Титов Л.П.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Использование толерогенных дендритных клеток (тДК) представляет собой перспективное направление специфической клеточной терапии аутоиммунных заболеваний. тДК также могут быть в перспективе использованы в трансплантологии с целью предупреждения отторжения органов и тканей. На сегодняшний день проводятся несколько клинических испытаний, целью которых является оценка безопасности и эффективности применения тДК. Однако разработка оптимального протокола получения ДК со стойкими толерогенными свойствами остается весьма актуальной. В данном исследовании было изучено влияние веществ с иммуносупрессирующими свойствами — интерлейкина-10, дексаметазона и витамина Д3 — на функциональное состояние ДК, полученных из моноцитов крови. Полученные нами данные указывают, что все исследованные вещества способны к направленной дифференцировки ДК в толерогенном направлении, что подтверждается функциональной незрелостью ДК, снижением антигенпрезентирующего потенциала, значимым усилением экспрессии коингибиторных молекул.

**Ключевые слова:** толерогенные дендритные клетки, аутоиммунные заболевания, глюкокортикостероиды, витамин Д, интерлейкин-10.

**Введение.** В настоящее время дендритные клетки (ДК), благодаря своим иммунофенотипическим и функциональным особенностям, по праву считаются главным связующим и направляющим звеном в развитии иммунного ответа. ДК в «незрелом» состоянии, находясь в нелимфоидных тканях, постоянно захватывают антигены путем микропиноцитоза. Поглощенные антигены подвергается процессированию и связыванию с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКС) I или II класса. Одновременно с этим начинается процесс созревания ДК, проявляющийся в изменении поверхностного иммунофенотипа, морфологии клеток, что приводит к приобретению способности ДК мигрировать в регионарные лимфоузлы. В Т-зависимых зонах лимфатических узлов происходит представление расщепленного антигена МНС-рестриктированным CD4+ или CD8+ Т-лимфоцитам [1].

Поскольку происходит одновременный захват как собственных, так и чужеродных антигенов, ДК выполняют сложную функцию распознавания опасного и неопасного сигнала. Внутриклеточные механизмы данного процесса изучены недостаточно, но именно благодаря этой функции ДК, становится возможным избежать развития аутоиммунного или хронического воспалительного процесса, ассоциированного с данным антигеном [2].

Благодаря возможности получать ДК *in vitro* из моноцитов периферической крови и стволовых клеток костного мозга, ДК активно используются в иммунотерапии многих онкологических и инфекционных заболеваний, то есть там, где необходима целенаправленная активация иммунной системы [3].

С начала 90-х гг. прошлого столетия ведется активное изучение ДК в свете выполнения ими толерогенной функции и участия в формировании периферической толерантности к антигенам. Идея использования толерогенных свойств ДК для иммунотерапии теоретически оправдана, так как в физиологических условиях в отсутствие инфекционного агента в организме человека преимущественно происходят процессы подавления иммунной реакции. Однако данный подход сталкивается с рядом проблем. Так, до конца не решен вопрос, ДК с каким характеристиками следует считать толерогенными: незрелые ДК, полузрелые ДК, либо существует отдельная субпопуляция ДК со стойкими толерогенными свойствами, способствующих формированию регуляторных Т-клеток [4].

Первым и наиболее подробно изученным веществом, способствующим получению ДК с толерогенными свойствами, является противоспалительный цитокин ИЛ-10 [5]. В настоящее время существует множество протоколов, с помощью которых в лабораторных условиях можно получить тДК, включающих воздействие иммуноингибирующих цитокинов или ростовых факторов, противовоспалительных лекарственных средств, а также использование генетической модификации ДК с целью продукции ими иммуносупрессивных белков [6].

Что касается использования тДК в практической медицине, то к настоящему времени опубликованы результаты трех клинических испытаний I фазы, в которых предпринимались попытки терапии аутоиммунных заболеваний при помощи тДК. Так, опубликованы результаты первых клинических испытаний вакцины на основе толерогенных ДК для лечения пациентов с сахарным диабетом 1-го типа [7], ревматоидным артритом [8]. Исследования показали безопасность и отсутствие серьезных побочных эффектов данной терапии, включая усиление проявлений болезни. В то же время полноценно оценить клиническую эффективность не представилось возможным. Опубликованы также результаты введения культур незрелых ИЛ-10 модифицированных ДК пациентам с рассеянным склерозом с целью подавления аутоиммунного ответа [9]. Результаты испытаний обнадеживающие: было отмечено снижение титра антител к миелину, увеличение числа регуляторных Т-клеток в крови.

**Цель** работы: изучение иммунофенотипа ДК, полученных из моноцитов периферической крови и культивированных в присутствии различных иммуносупрессивных веществ.

**Материалы и методы.** Получение ДК. Исследование проводили с использованием гепаринизированной венозной донорской крови, доставленной из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Кровь наслаивали на градиент фиколл-пака с плотностью 1,077 г/л для последующего выделения мононуклеарных клеток (МНК). Моноциты были выделеныиз фракции МНК путем адгезии на поверхности пластика с последующим культивировании в питательной среде AIM-V. Добавление цитокинов для дифференцировки ДК осуществляли по следующей схеме: 1-й образец (контроль) — ИЛ-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл); 2-й образец (VitD3-DC) — ИЛ-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл), витамин D3 (10 nM); 3-й образец (Dex-DC) — ИЛ-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл), дексаметазон (10 nM); 4-й образец (IL10-DC) — IL-4 (25 нг/мл), GM-CSF (100 нг/мл), IL-10 (50 ng/ml).Культуры клеток инкубировали при 37ºС в увлажненной атмосфере с 5% $CO_2$ в течение 6 сут. Добавление/смену питательной среды и цитокинов проводили в каждой культуре на 3 сут.

***Проточная цитофлуометрия.*** На поверхности незрелых ДК (6 сут культивирования) исследовали экспрессию следующих молекул: CD1a, CD14, CD16, HLA-DR, CD83, CD80, CD86, CD205, CD206, CD208, CD209, CD273 и CD274. Учет иммунофенотипа проводили на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur».Анализ полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения «FACSDiva».

***Статистический анализ.*** Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ «Statistica» версии 10 и «StatPlus»версии 4.9. Значения показателей представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха между 25 и 75-й процентилями. Нормальность распределениявеличин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения независимых выборок использовали непараметрические критерии (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$.

**Результаты.** С целью исследования иммунофенотипа полученных культур были использованы маркеры для оценки различных стадий дифференцировки ифункционального состояния ДК (таблица 1).

Оценивали процент экспрессии молекулы, а также относительную интенсивность флуоресценции (ОИФ), рассчитанную как отношение средней интенсивности исследуемого антигена к средней интенсивности негативного образца. На рисунках 1 и 2 представлены гистограммы наиболее репрезентативных образцов, построенные по интенсивности флуоресценции исследуемых маркеров (сплошная линия) в сравнении с контрольной пробой (пунктирная линия).

Так, в сравнении с контрольным образцом, ДК, культивированные в присутствии витамина Д3, дексаметазона и ИЛ-10, характеризовались более незрелым фенотипом, что проявлялось в высокой экспрессии молекул CD14 (контроль — 2,6 (1,7–4,3)%; VitD3-DC — 6,7 (5,1–8,3)%, $p<0,0001$; Dex-DC — 95,1 (93,8–99,5)%, $p<0,0001$; IL10-DC — 18,7 (16,4–20,1)% , $p<0,01$;) и CD16 (контроль — 2,2 (1,8–4,9)%; VitD3-DC — 9,1 (7,7–12,1)%, $p<0,01$; Dex-DC — 62,1 (60,0–66,1)%, $p<0,0001$; IL10-DC — 18,9 (17,9–22,1)% , $p<0,001$;), а также в снижении относительной интенсивности экспрессии молекулы CD1a (рисунок 1).

Таблица 1 — Характеристика исследуемых CD антигенов

| Молекула | Экспрессия на клетках | Функция |
|---|---|---|
| CD1a | Кортикальные тимоциты, незрелые ДК, клетки Лангерганса | Является структурным аналогом молекулы MHCI класса, участвует в презентации липидных антигенов |
| CD14 | Специфический маркер макрофагов/моноцитов | Рецептор для липополисахарид-связывающего белка |
| CD16 | Моноциты, макрофаги, натуральные киллеры, нейтрофилы | Низкоаффинный Fc-рецептор (FcγRIIIa и FcγRIIIb) |
| HLA-DR | АПК, активированные Т-лимфоциты | ГКС 2-го класса, участие в антигенпрезентации |
| CD83 | ДК, клетки Лангерганса | Высокоспецифичный маркер зрелых ДК — молекулы, участвующей в процессах активации Т-лимфоцитов |
| CD80(B7-1), CD86 (B7-2) | АПК: ДК, активированные В- лимфоциты, моноциты | Рецепторы для молекул CD28 и CD152 (CTLA-4), участвуют в костимуляции Т-лимфоцитов |
| CD205 | ДК, кортикальные тимоциты | Рецептор, отвечающий за распознавание и кросс-презентацию антигенов клеток, находящихся в апоптозе или некрозе |
| CD206 | ДК, макрофаги, моноциты | Фагоцитоз и пиноцитоз маннозосодержащих молекул |
| CD208 (DC-LAMP) | Активированные ДК | Участвует в процессировании экзогенных антигенов |
| CD209 (DC-SIGN) | ДК, макрофаги | Лектин типа С, связывается с ICAM-3, ICAM-2; активирует фагоцитоз, опосредует взаимодействие ДК с эндотелием, активацию Т-клеток, а также распознавание патогенных гаптенов |
| CD273(B7-DC), CD274 (B7-H1) | Незрелые и зрелые ДК, фолликулярные ДК | Рецепторы для PD-1, снижают пролиферативную активность Т-лимфоцитов |

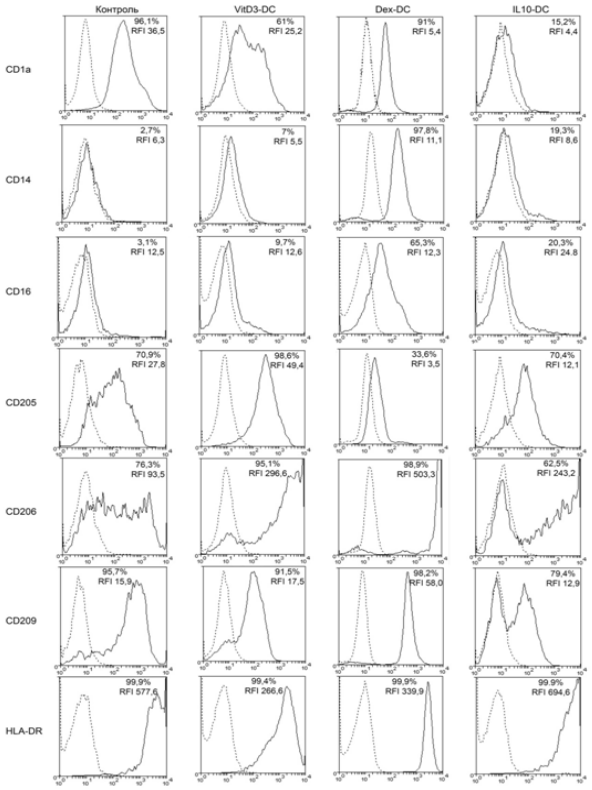



Рисунок 1 — Влияние ИЛ-10, дексаметазона и витамина Д3 на экспрессию молекул CD1a, CD14, CD16, CD205, CD206, CD209 и HLA-DR

Относительная интенсивность экспрессии патоген-распознающего рецептора молекулы CD209, ответственной за процесс эндоцитоза, в контрольной культуре практически не отличалась от показателей в VitD3-DC и IL10-DC, при этом ДК, полученные с добавлением дексаметазона, характеризовались более высоким показателем (рисунок 1). Также следует отметить значительное повышение ОИФ маннозного рецептора CD206 в культурах с ингибирующими веществами в отличие от контроля, что доказывает незрелость полученных ДК.

Процент экспрессии HLA-DR в исследуемых культурах значительно не отличался и оставался на высоком уровне, однако ОИФ в культурах с дексаметазоном и витамином Д3 в сравнении с контрольной оказалась меньше, что может указывать на нарушение функции антигенпрезентации (рисунок 1).

Экспрессия важного рецептора для формирования периферической толерантности отвечающий за кросс-презентацию пептидов клеток, находящихся в состоянии апоптоза или некроза, CD205 была выше в сравнении с контролем в культуре VitdD3-DC, но при этом нарушена при оценке культур Dex-DC и IL10-DC (рисунок 2).

Оценка экспрессии коингибиторных молекул CD273 и CD274, негативно влияющих на активацию специфических Т-клеток, показала увеличение процента экспрессии во всех культурах с супрессирующими веществами (CD273: контроль — 84,6 (82,8–88,1)%; VitD3-DC — 97,7 (95,9–99,7)%, $p<0,05$; Dex-DC — 98,3 (96,1 – 99,9)%, $p<0,05$; IL10-DC — 88,7 (86,1–93,5)%, $p<0,05$; CD274: (контроль — 55,9 (52,7–59,1)%; VitD3-DC — 96,1 (95,8–99,1)%, $p<0,001$; Dex-DC — 95,3 (92,7–98,7)%, $p<0,001$; IL10-DC — 89,1 (86,4–92,5)%, $p<0,001$).

В дополнение следует отметить снижение относительной интенсивности экспрессии костимуляторной молекулы CD80 (рисунок 2),усиливающейся в процессе активации и созревания ДК, в культурах, полученных в толерогенном направлении.

Оценка маркеров активации и созревания ДК CD83 и CD208 не выявило значительных изменений их экспрессии в сравнении с контрольной культурой.

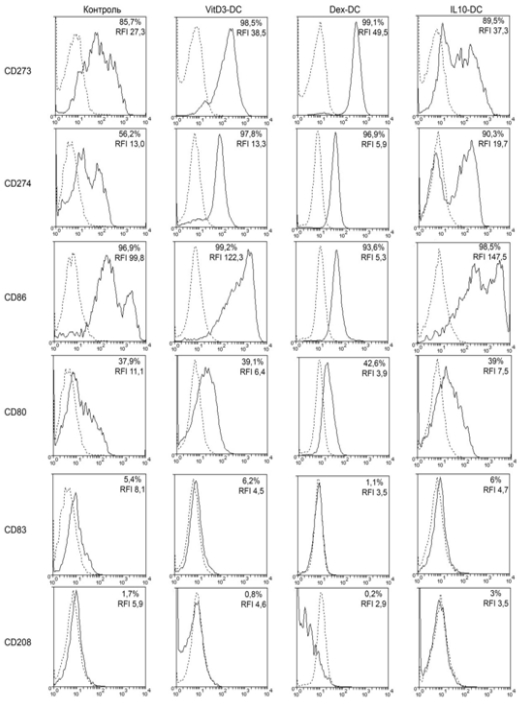



Рисунок 2 — Влияние ИЛ-10, дексаметазона и витамина Д3 на экспрессию костимуляторных, коингибиторных молекул и маркеров зрелости ДК

**Выводы.** Исследования в направлении поиска оптимальной комбинации цитокинов, способной привести к воспроизводимому получению толерогенных ДК, являются важными для прикладной иммунологии в лечениаутоиммунных заболеваний, а также при пересадке органов.

Полученные нами данные указывают, что все исследованные вещества способны вызывать направленную дифференцировку ДК в толерогенном направлении, что подтверждается функциональной незрелостью ДК, снижением антигенпрезентирующего потенциала, значимым усилением экспрессии коингибиторных молекул. Вместе с тем, выявлены существенные различия в экспрессии молекул CD1a, CD14, CD205 и CD209 тДК под действием дексаметазона, витамина Д3 и интерлейкина-10, что может приводить к различиям в функциональной активности тДК, и требует проведения дополнительных функциональных исследований.

**Литература**

1. Steinman, R.M. Tolerogenicdendriticcells / R.M. Steinman [et al.] // Ann. Rev. Immunol. — 2003. — Vol. 21. — P. 685–711.

2. Adrian, E.M. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction / E.M. Adrian, W.T. Angus // Immunol. Rev. — 2003. — Vol. 196. — P. 125–146.

3. On dendritic cell-based therapy for cancers / O. Morikazu [et al.] // J. Zhejiang Univ. SCI. — 2005. — Vol. 6B, № 1. — P. 1–3.

4. Lutz, M.B. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? / M.B. Lutz, G. Schuler // Trends Immunol. — 2002. — Vol. 23. — P. 445–449.

5. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction — A comparative study of human clinical-applicable DC / A. Martine [et al.] // Clin. Immunol. — 2012. — Vol. 142. — P. 332–342.

6. Generation of immunogenic and tolerogenic clinical-grade dendritic cells / T. Kalantari [et al.] //Immunol Res. — 2011. — Vol. 51. — P. 153–160.

7. Phase I (Safety) Study of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells in Type 1 Diabetic Patients / N. Giannoukakis [et al.] // Diabetes Care. — 2011. — Vol. 34. — P. 2026–2032.

8. Safety and preliminary evidence of efficacy in a phase I clinical trial of autologous tolerising dendritic cells exposed to citrullinated peptides (Rheumavax) in patients with rheumatoid arthritis / R. Thomas [et al.] // Ann. Rheum. Dis. — 2011. — Vol. 70, Suppl. 3. — P. 169.

9. Аутогенные IL-10 модифицированные дендритные клетки в иммунотерапии рассеянного склероза: первый клинический опыт / М.М. Одинак [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. — Т. 3, № 4. — С. 60–65.

## IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITITC CELLS CULTURED TOWARDS TOLEROGENIC PROFILE

**Ramanava I.U., Hancharou A.Y., Titov L.P.**
*Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus*

Theusageoftolerogenic dendritic cells (TDC) is a promising in specific cell therapy of autoimmune diseases. TDC may also potentially be used in transplantation to prevent rejection of organs and tissues. To date, several clinical trials are conducted, the purpose of which is to evaluate the safety and efficacy of TDC.However, the development of optimal protocol for obtaining of TDCs with persistent properties is very important.In this study we investigated the effects of substances with immunosuppressive properties on the functional state of DCs derived from blood monocytes, which includeinterleukin-10, dexamethasone and vitamin D3. Our data indicate that all of the investigated substances werecapable todirectthe differentiation of DCs into tolerogenic profile that was proved by the functional immaturity of DC, impairment of antigenpresenting capacity and a significant increase ofthe expression of co-inhibitory molecules.

**Keywords:** tolerogenic dendritic cells, autoimmune diseases, glucocorticosteroids, vitamin D, interleukin-10.

Поступила 04.09.2013

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM* МЕТОДОМ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

**Руденкова Т.В., Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Полуян О.С.**
*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Проведено определение антибиотикорезистентности клинических изолятов Mycoplasma genitalium к группам препаратов (тетрациклины, макролиды), применяемым при лечении инфекций урогенитального тракта, обусловленных присутствием данного возбудителя. В изолятах *Mycoplasma genitalium* было исследовано присутствие tet-детерминант устойчивости к тетрациклинам, а также для выявления устойчивости к макролидам были изучены нуклеотидные последовательности гена 23S рРНК возбудителя. Полученные результаты позволили подтвердить широкую распространенность штаммов *Mycoplasma genitalium* устойчивых к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов (52,94%), а также установить распространенность штаммов возбудителя устойчивых к препаратам группы макролидов (26,47%).

**Ключевые слова:** *Mycoplasma genitalium*, генетические маркеры, антибактериальные препараты, устойчивость–чувствительность.

**Введение.** Впервые возбудитель *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) был описан в 1981 г., когда данный микроорганизм был выделен от двух из 13 мужчин с негонококковым уретритом [1]. *M. genitalium* является причиной развития воспалительных процессов урогенитального тракта у мужчин (негонококковый уретрит) и женщин (аднексит, цервицит, кольпит), выступает в роли самостоятельного фактора влияющего на развитие осложнений течения беременности (угроза прерывания беременности, фетоплацентарная недостаточность, анемия, гестоз, преждевременное старение плаценты), а также может быть причиной перинатального инфицирования новорожденных [2, 3].

При лечении инфекций урогенитального тракта, обусловленных *M. genitalium*, на сегодняшний день широко используют такие группы антибактериальных препаратов как тетрациклины и макролиды [4, 5]. При недостаточном и неэффективном лечении *M. genitalium*-индуцированных инфекций, не происходит полной элиминации возбудителя из организма, что приводит к его персистенции в макроорганизме. Для успешного лечения инфекции, с полной элиминацией возбудителя, необходимо проводить назначение антибиотикотерапии с учетом лабораторных исследований, включающих определение чувствительности-устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам [6]. Лечение инфекций с применением широкого спектра антибактериальных препаратов привело к росту числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Это делает актуальным решение задачи по изучению механизмов формирования антибиотикорезистентности у микро-

организмов, а также разработку методов определения устойчивости инфекционных агентов к антибактериальным препаратам [8, 9].

Использование культурального метода для выявления *M. genitalium* и определения чувствительности-устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам является очень трудоемким и длительным и может занимать от нескольких недель до нескольких месяцев, т. к. *M. genitalium* относится к трудно культивируемым микроорганизмам. Для этих целей используют методы молекулярно-биологического анализа (метод полимеразной цепной реакции — ПЦР, секвенирующей ПЦР) [5, 7].

Появление устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам ряда тетрациклинов обеспечивают шесть классов tet-генов (tetM, tetO, tetB P, tet Q, tetS и otrA) через механизм защиты рибосом. Присутствие tet-генов в геноме возбудителя обеспечивает защиту бактериальной клетки от воздействия препаратов ряда тетрациклина путем изменения конформации рибосомы таким образом, что сродство антибиотика к местам узнавания резко снижается.

Включение в геном *M. genitalium* стрептококковой детерминанты устойчивости к тетрациклину (например tet-M) является результатом переноса генов между филогенетически неродственными микроорганизмами, т. е. может служить примером миграции генов между различными неродственными генетическими системами. Наличие tet-детерминант является маркером резистентности возбудителя к антибактериальным препаратам ряда тетрациклинов и может служить основой для выбора рационального подхода к антибактериальной терапии [7, 10].

Во многих исследованиях было показано, что макролиды обладают высокой антимикробной активностью по отношению к *M. genitalium*, тогда как активность тетрациклинов ниже [11]. Однако, в 5–28% случаев, при лечении инфекций, обусловленных *M. genitalium* с использованием антибактериальных препаратов группы макролидов, у пациентов не удается достичь полной элиминации возбудителя. Наибольший процент неудач (28%) связан с предшествующим назначением пациенту лечения инфекционного процесса однократным приемом азитромицина в дозе 1 г [12, 13].

Устойчивость к антибактериальным препаратам из группы макролидов у M. genitalium связана с нуклеотидными заменами в V домене гена 23S рРНК в позициях A2058, A2059, C2038 и A2062 (*E.coli*). Изучение нуклеотидной последовательности в данном регионе генома возбудителя позволяет выявлять микроорганизмы устойчивые к препаратам группы макролидов [5, 9, 13].

**Целью** исследования было изучить присутствие у клинических изолятов *M. genitalium* генетических маркеров устойчивости к группам антибактериальных препаратов (тетерациклины, макролиды), применяемым при лечении инфекций урогенитального тракта, обусловленных присутствием данного возбудителя.

**Материалы и методы.** Группу исследования составили беременные с осложнениями течения беременности (угроза прерывания беременности, фетоплацентарная недостаточность, анемия, гестоз, преждевременное старение плаценты). Все пациентки были обследованы на наличие ИППП методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

В качестве биологического материала для выполнения исследований методом ПЦР-РВ использовали соскобы эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала. По результатам проведенного исследования были отобраны образцы с моно-*M.genitalium*-инфекцией (n=34). В данных клинических изолятах проводили определение генетических маркеров устойчивости *M. genitalium* к двум группам антибактериальных препаратов: тетрациклины и макролиды.

Для определения устойчивости *M. genitalium* к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов было проведено выявление tet-детерминант в геноме возбудителя. Исследование проводилось с применением метода классической ПЦР с электрофоретическим форматом детекции.

Для амплификации фрагмента гена использовались праймеры:

tet-f – 5'- GGMCAYRTGGATTTYWTAGC-3' (forward);

tet-r – 5'- TCAGMCGGAGTRCTARCAGGRC-3' (reverse).

Амплифицируемый фрагмент включал 1 315 п.о. [10].

Для проведения амплификации в каждую пробирку объемом 0,5 мл добавляли 30 мкл амплификационной смеси: 5 мкл деионизированной воды, 20 мкл Taq PCR Master Mix (QIAGEN) и 5 мкл смеси, содержащей 25 рмоль/мкл каждого праймера. Добавляли 25 мкл минерального масла. Под слой масла вносили 10 мкл анализируемого образца, а в пробирку отрицательного контроля 10 мкл деионизированной воды. Все пробы включая контроли ставили в дублях. Амплификацию проводи-

ли с использованием термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по следующей программе: 95°С — 4 мин; 45 циклов — 95°С — 30 с, 52°С — 30 с, 72°С — 30 с.

Полученные ампликоны анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 1% бромистый этидий. При этом определяли наличие специфического фрагмента амплификации на уровне 1315 п.о.

При положительном результате амплификации фрагмента tet-детерминанты (1315 п.о.) делали заключение о наличии у *M. genitalium* устойчивости к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов, а при отсутствии амплификации данного фрагмента — о чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам данной группы.

Для определения устойчивости *M. genitalium* к антибактериальным препаратам группы макролидов было проведено выявление нуклеотидных замен в гене 23S рРНК возбудителя. Исследование проводилось с применением секвенирующей ПЦР.

Для амплификации фрагмента гена использовались праймеры:

M.g.23S f- 5′- CCATCTCTTGACTGTCTCGGCTAT -3′ (forward)

M.g.23S r- 5′- CCTACCTATTCTCTACATGGTGGTGTT -3′ (reverse),

амплифицируемый фрагмент включал 147 п.о.

Для проведения амплификации в каждую пробирку объемом 0,5 мл добавляли 30 мкл амплификационной смеси: 5 мкл деионизироованной воды, 20 мкл Taq PCR Master Mix (QIAGEN) и 5 мкл смеси, содержащей 25 рмоль/мкл каждого праймера. Добавляли 25 мкл минерального масла. Под слой масла вносили 10 мкл анализируемого образца, а в пробирку отрицательного контроля 10 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по следующей программе: 95°С — 5 мин; 45 циклов — 95°С — 15 с, 60°С — 60 с.

Полученные ампликоны анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 1% бромистый этидий. При этом определяли наличие специфического фрагмента амплификации на уровне 147 п.о.

Далее амплифицированные фрагменты ДНК подвергали очистке с использованием набора PCR Gel Eextraction kit (QIAGEN), а затем проводили секвенирующую ПЦР с использованием набора BigDye Terminator v3.1 (Applied biosystems) и прямого (forward) праймера (M.g.23S f). Полученные фрагменты ДНК подвергали очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied biosystems). Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2, в качестве референсной использовали последовательность гена 23S рРНК, размещенную на сайте http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_077054.1 (Mycoplasma genitalium G37 strain G-37 23S ribosomal RNA, complete sequence).

**Результаты и их обсуждение.** Выявление tet-детерминант устойчивости *M. genitalium* к препаратам тетрациклинового ряда проводили в 34 клинических образцах содержащих ДНК *M. genitalium*. Анализ полученных в ходе исследования результатов, позволил установить, что в 18 образцах (52,94%) присутствовали tet-детерминанты устойчивости. Это позволяет сделать вывод о широкой распространенности штаммов M. genitalium устойчивых к действию препаратов тетрациклинового ряда. Таким образом, назначение препаратов тетрациклинового ряда без проведения предварительного анализа чувствительности-устойчивости возбудителя может быть не эффективным более чем в 50% случаев.

Проведение исследований с использованием секвенирующей ПЦР позволило обнаружить изменения в последовательностях нуклеотидов в V домене гена 23S рРНК у исследованных клинических изолятов *M. genitalium*. Наличие нуклеотидных замен в данном гене обуславливает формирование у *M. genitalium* резистентности к антибактериальным препаратам группы макролидов. В ходе проведения исследования было проанализировано 34 клинических образца содержащих ДНК *M. genitalium*. Анализ полученных в ходе исследования результатов, позволил установить, что в 9 образцах (26,47%) присутствовали нуклеотидные замены.

В позиции 2059 нуклеотидные замены были выявлены в 17,65% (n=6) случаев: при этом в 11,77% (n=4) случаев — замена A→G; в 2,94% (n=1) случаев — A→C; в 2,94% (n=1) случаев — A→T. В позиции 2058 было обнаружено 5,88% (n=2) случаев замен A→G. В 2,94% (n=1) случаев было обнаружено одновременно 2 нуклеотидные замены в одном образце в позициях 2058 A→G и 2038 C→T.

В ходе исследования в клинических изолятах *M. genitalium* были выявлены генетические маркеры устойчивости к антибактериальным препаратам группы макролидов (нуклеотидные замены). Распространенность штаммов возбудителя резистентных к препаратам группы макролидов может являться как следствием неудачной попытки элиминации возбудителя препаратами группы макролидов в прошлом, так и следствием циркуляции антибиотикорезистентных штаммов инфекционного агента в популяции. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что эмпирическое назначение антибактериальных препаратов группы макролидов в 26,47% случаев может быть не эффективным, и, как следствие, не приводить к элиминации возбудителя из организма пациента.

**Выводы.** Полученные в ходе проведения исследования данные позволили подтвердить широкую распространенность штаммов *M. genitalium* устойчивых к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов. Был проведен анализ распространенности штаммов возбудителя устойчивых к антибактериальным препаратам группы макролидов в клинических изолятах *M. genitalium*. Результаты исследования хорошо согласуются с литературными данными по распространенности антибиотикорезистентных штаммов *M. genitalium*. Полученные данные позволяют сделать вывод о необходимости проведения исследований направленных на выявление генетических маркеров устойчивости *M. genitalium* к антибактериальным препаратам до назначения антибактериальной терапии. Выбор леченой тактики без предварительного проведения молекулярно-биологического анализа по определению устойчивости *M. genitalium* к действию антибиотиков может приводить к переходу инфекционного процесса в хроническую форму, а также к формированию и распространению антибиотикорезистентных штаммов возбудителя.

**Литература**


1. Tully, J.G. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract / J.G. Tully // Lancet. — 1981. — Vol. 1. — P. 1288–1291.
2. Дорошевич В.В., Андреева Н.Л., Руденкова Т.В., Костюк С.А., Марковская Т.В. Особенности течения беременности на фоне инфекций урогенитального тракта, обусловленных *Mycoplasma genitalium* / В.В. Дорошевіч [и др.] // ARS medica. — 2011. — № 14 (50). — С. 147.
3. Оценка риска инфицирования новорожденных при моно- и микст-инфекциях урогенитального тракта у родильниц / Т.В. Руденкова [и др.] // ARS medica. — 2011. — № 15 (51). — С. 315–317.
4. Шиманская, И.Г. Клинические протоколы диагностики и лечения инфекций, передаваемых половым путем / И.Г. Шиманская. — Минск, 2009. — 88 с.
5. Hamasuna, R. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by Taq Man 5 nuclease real-time PCR / R. Hamasuna, Y. Osada, J.S. Jensen // Antimicrobe Agents and Chemotherapy. — 2005. — Vol. 49. — P. 4993–4998.
6. Bjornelius, E. Antibiotic treatment of symptomatic Mycoplasma genitalium infection in Scandinavia : a controlled clinical trial / E. Bjornelius // Sex. Transmited Infect. — 2008. — Vol. 84. — P. 72–76.
7. Jensen, J.S. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples / J.S. Jensen // J. Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29. — P. 46–50.
8. Прозоровский, С.В. Медицинская микоплазмология / С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович. — М.: Медицина, 1995.
9. Hamasuna, R. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with Vero cells / R. Hamasuna, Y. Osada, J.S. Jensen // J. Clin. Microbiol. — 2007 — Vol. 45. — P. 847–850.
10. Falk, L. Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium* / L. Falk, H. Fredlund, J.S. Jensen // Sex. Transmited Infect. — 2003. — Vol. 79. — P. 318–319.
11. Pich, O.Q. Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement / O.Q. Pich // Microbiology. — 2006. — Vol. 152. — P. 519–527.
12. Bradshaw, C.S. Azithromycin failure in Mycoplasma genitalium urethritis / C.S. Bradshaw // Emerg. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 2. — P. 1149–1152.
13. Chrisment, D. Detection of macrolide resistance in Mycoplasma genitalium in France / D. Chrisment // J. Antimicrob. Chemotherapy. — 2012. — Vol. 67, № 11. — P. 2598–2601.


## DETECTING OF *MYCOPLASMA GENITALIUM* CLINICAL ISOLATES ANTIBIOTIC RESISTANCE DUE TO GENETIC ANALYSIS METHOD


**Rudenkova T.V., Kostiuk S.A., Badigina N.A., Poluyan O.S.**

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



Research for genetic markers of Mycoplasma genitalium resistance to groups of antibacterial medicines (tetracycline, macroleads), applied for treatment of urogenital tract infections, caused by

presence of this causative agent, was performed. Tet-determinantes revealing, nucleotide sequences of 23S rRNA gene analysis has been carried out in Mycoplasma genitalium clinical isolates. The received results have allowed to confirm wide prevalence of Mycoplasma genitalium isolates resistant to tetracycline group antibacterial medicines (52.94%) and to define prevalence of infectious agent isolates which was resistant to macroleads (26.47%).

**Keywords:** *Mycoplasma genitalium*, genetic markers, antibacterial medicines, resistance-sensitivity.

Поступила 04.09.2013

## НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ КИШЕЧНЫЕ ВИРУСЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ В РАМКАХ НАДЗОРА ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С СИНДРОМОМ ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Самойлович Е.О.[1], Свирчевская Е.Ю.[1], Ермолович М.А.[1], Семейко Г.В.[1], Иванова О.Е.[2], Гмыль А.П.[2]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь;*

*[2]Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия*

**Резюме.** В течение 1996–2012 гг. при исследовании двух образцов стула от 769 детей с синдромом острого вялого паралича (ОВП) неполиомиелитные вирусы были изолированы от 42 (5,5%) детей. С использованием рекомендованных ВОЗ методов было идентифицировано 38 неполиомиелитных вирусов, которые были представлены вирусами Коксаки В трех серогрупп (Коксаки В1 — 3 пробы, Коксаки В5 — 7, Коксаки В4 — 2), вирусами Экхо шести серогрупп (Экхо 11 — 7 проб, Экхо 24 — 3, Экхо 7 — 2, Экхо 25 — 4, Экхо 6 — 2, Экхо 14 — 1), аденовирусами (обнаружены в 7 пробах). Не во всех случаях выявленные вирусы являлись этиологическими агентами ОВП. Наиболее вероятной их этиологическая роль была в случаях ОВП с выделением вирусов Коксаки В4, Экхо 25 и Коксаки В5.

**Ключевые слова:** острые вялый паралич, неполиомиелитные кишечные вирусы.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ одним из основных компонентов надзора за полиомиелитом в контексте инициативы глобальной ликвидации этого заболевания является надзор за заболеваниями, протекающими с синдромом острого вялого паралича (ОВП) у детей до 15 лет. Как известно, сложный клинический синдром, носящий название ОВП, может иметь множество возможных причин развития. Определение причины ОВП является основанием для правильного лечения и прогноза. Наряду с полиовирусами (ПВ), этиологическими агентами синдрома ОВП могут являться и неполиомиелитные энтеровирусы, аденовирусы, герпесвирусы, вирусы парагриппа и эпидемического паротита, тогавирусы и др. В таких случаях полиомиелитоподобные паралитические заболевания нередко сочетаются с другими клиническими синдромами, такими как асептический менингит, менингоэнцефалит и др. Вирусологическое обследование больных с синдромом ОВП имеет чрезвычайно важное значение для этиологической расшифровки диагноза [1].

Основной **целью** настоящей работы являлся анализ частоты выделения неполиомиелитных кишечных вирусов от детей с синдромом острого вялого паралича и идентификация выделенных вирусов.

В течение 1996–2012 гг. в Национальном референс-центре по полиомиелиту проведено вирусологические обследовано 769 детей с синдромом ОВП из всех регионов Республики Беларусь. Обследование проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ для национальных лабораторий по полиомиелиту [2]. От каждого ребенка исследовано по 2 пробы стула. Выделение вирусов осуществляли с использованием культур клеток RD и L20D, дополнительно также использовалась культура клеток Hep2C. Полученные в любой из культур клеток вирусные изоляты исследовали в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ 1, 2 и 3 типов (ПВ1, ПВ2 и ПВ3 соответственно) производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН или Института общественного здоровья, Билтховен, Нидерланды). Все изоляты, в которых полиовирус не определялся, были исследованы в реакции нейтрализации с использованием набора типоспеци-

фических сывороток к энтеровирусам (производства Института общественного здоровья, Билтховен, Нидерланды). Дополнительно для изолятов, выделенных в 2009 г. и позднее, была выполнена идентификация аденовирусов с применением коммерческой диагностической ПЦР-тест-системы производства «АмплиСенс» (Россия). Выделение вирусной ДНК из культуральной жидкости проводили с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Выполнено секвенирование VP3/VP1/2A участка генома вируса Коксаки B5.

В течение периода наблюдения неполиомиелитные вирусы были изолированы от 42 детей с синдромом ОВП. Частота изоляции составила 5,5%. С 1996 по 1999 гг. частота изоляции составляла от 10 до 18,5% [3]. В последующие годы (2000–2012 гг.) она снизилась и составила от 0 до 8,7%. Из 42 случаев ОВП с выделением неполиомиелитных вирусов вирус был изолирован из обеих исследованных проб стула в 24 случаях, в 18 случаях только одна из исследованных проб содержала вирус. В целом неполиомиелитные энтеровирусы были выделены из 66 проб стула.

В результате проведенного с помощью вышеописанной методологии исследования было идентифицировано 38 вирусов, изолированных от 23 детей. Вирусы Коксаки были обнаружены в 12 пробах стула 7 детей (Коксаки B1 — 3 пробы, Коксаки B5 — 7, Коксаки B4 — 2). Вирусы Экхо обнаружены в 17 пробах стула 10 детей (Экхо 11 — 6 проб, Экхо 24 — 3, Экхо 7 — 2, Экхо 25 — 4, Экхо 6 — 2). От одного ребенка, обследованного только через 1,5 мес. после начала паралича) из первой пробы был изолирован вирус Коксаки B5, из второй — Экхо 14. Аденовирусы были обнаружены в 7 пробах стула 5 детей.

Роль неполиомиелитных вирусов в этиологии спорадических случаев ОВП труднодоказуема. Во многих случаях обнаружение неполиомиелитного вируса в образце стула ребенка являлось «случайной» находкой, совпавшей по времени с возникновением паралича, обусловленного другой причиной (травматические, постинъекционные невриты). Зачастую неполиомиелитные вирусы присутствовали только в одной из двух исследованных проб стула; цитопатический эффект при первичном заражении культуры клеток развивался медленно (на 4–5 дней) и был слабовыраженным, либо развивался только в слепом пассаже, что свидетельствует о низкой концентрации вируса в образце стула. Однако в нескольких случаях этиологическая роль неполиомиелитных энтеровирусов представлялась наиболее вероятной. В случае полиомиелитоподобного заболевания с незначительным остаточным параличом ноги и выделением вируса Коксаки B4 (1998 г.), в случае энцефалита с мозжечковой атаксией и выделением вируса Экхо 25 (2000 г.), в случае полинейропатии с нижним вялым парапарезом и выделением вируса Коксаки B5 (2012 г.). Во всех этих случаях развитию паралича способствовал выраженный общеинфекционный синдром (повышение температуры тела, выраженная интоксикация). В первом и втором случаях в сыворотках крови детей были выявлены нейтрализующие антитела к аутоштаммам в высоких титрах. В случае полинейропатии с выделением вируса Коксаки B5 у ребенка 3 лет аутоантитела исследованы не были. Этот случай совпал с высокой частотой обнаружения вируса Коксаки B5 в сточных водах в данном регионе. Выполненное секвенирование участка генома, кодирующего VP3/VP1/2A белки вируса Коксаки B5, выделенного от ребенка с синдромом ОВП, показало, что наиболее близкородственным ему (98% гомологии) является изолят Коксаки B5, выделенный в 2011 г. в Китае в провинции Henan во время вспышки вирусных энцефалитов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в течение 1996–2012 гг. неполиомиелитные вирусы выделялись от детей с ОВП с частотой 5,5%. Среди 38 идентифицированных изолятов вирусы Коксаки составили 36,8%, вирусы Экхо — 44,7%, аденовирусы — 18,4%. Среди вирусов Коксаки наиболее часто выделялся вирус серотипа B5, среди вирусов Экхо — серотипа 11.

**Литература**

1. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. — Женева: ВОЗ, 2005. — 112 с.

2. Adenovirus isolation rates in acute flaccid paralysis patients / O.E. Ivanova [et al.] // J. Med. Virol. — 2011. — Vol. 84, № 1. — P. 75–80.

3. Вирусологическая характеристика заболеваний с синдромом острого вялого паралича у детей / Е.О. Самойлович [и др.] // Белорус. мед. журн. — 2003. — № 4. — С. 92–95.

## NON-POLIO ENTERIC VIRUSES ISOLATED WITHIN ACUDE FLACCID PARALISIS SURVEILLANCE IN REPUBLIC OF BELARUS

**Samoilovich E.O.[1], Svirchevskaya E.Ju.[1], Yermalovich M.A.[1], Semeiko G.V.[1], Ivanova O.E.[2], Gmyl A.P.[2]**

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

*[2]Institute of poliomyelitis and virus encephalitis by M.P Chumakova, Moscow, Russia*

Within 1996–2012 in Belarus 769 children with acute flaccid paralysis (AFP) syndrome were revealed and virologicaly examinated. Non-polio enteric viruses were isolated from 42 (5.5%) of them. Usind WHO recommended methods, 38 viruses were identified. They belonged to Coxsackie viruses of 3 serotypes (type B1 — in 3 samples, type B5 — in 7 samples, type B4 — in 2 samples), to Echo viruses of 6 serotypes (Echo11 — in 6 samples, Echo 24 — in 3 samples, Echo 7 — in 2 samples, Echo 25 — in 4 samples, Echo 6 — in 2 samples, Echo 14 — in 1 sample), to adenoviruses — in 7 samples. Not in all cases isolated viruses were causative agent of AFP. The most probably it was in case of isolation Coxsakie virus B4, Echo virus 25, Coxsakie virus B5.

Поступила 02.09.2013

## ПОЛУЧЕНИЕ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЙ ЭКСПРЕССИЮ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА ВИРУСА ЭБОЛА

**Семижон П.А., Счесленок Е.П., Школина Т.В., Фомина Е.Г., Владыко А.С.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Получена гибридная векторная конструкция pJC40/NP EBO, обеспечивающая экспрессию рекомбинантного полипептида, представляющего антигензначимый участок нуклеокапсидного белка вируса Эбола, в прокариотической системе *E. coli*, штамм BL 21 (DE3).

**Ключевые слова:** вирус Эбола, специфичность амплифицированного фрагмента ДНК, экспрессирующая гибридная плазмида, рекомбинантный полипептид.

**Введение.** Вирус Эбола, относящийся к семейству Filoviridae, вызывает у людей опасную одноименную геморрагическую лихорадку с уровнем летальности до 90% [1]. Практически ежегодно отмечаются спорадические случаи заболевания лихорадкой Эбола в южных и центральных районах Африканского континента. Последняя вспышка лихорадки Эбола датируется 30 ноября 2012 г.: по состоянию на 28.11.2012 г. Министерство здравоохранения Уганды сообщило о 7 (6 подтвержденных, 1 возможном) случаях заболевания геморрагической лихорадкой Эбола в районах Луверо и Кампала, 4 из этих случаев закончились смертельным исходом (данные сайта ВОЗ). До настоящего времени природный резервуар данной инфекции не установлен, однако приводятся данные, что в естественных условиях потенциальными источниками вируса Эбола могут являться грызуны и летучие мыши [2, 3]. Инкубационный период составляет от 2 до 21 дня, заболевание характеризуется внезапным повышением температуры, выраженной общей слабостью, мышечной и головной болью, а также болью в горле, сопровождается рвотой, диареей, сыпью, нарушением функций почек и печени, а в некоторых случаях как внутренними, так и внешними кровотечениями.

Вирус Эбола обладает высокой контагиозностью, может быть использован в качестве биотеррористического агента, кроме этого постоянно растет вероятность завоза данной инфекции с эндемичной территории в любую страну мира из-за роста торгово-экономических интеграций. Все это обусловливает особое внимание структур здравоохранения большинства стран мира к данной проблеме как в сфере изучения особенностей самого вируса, так и для обеспечения санитарно-эпидемического благополучия населения в целом. Для предотвращения возникновения чрезвычайной ситуации необходимо проведение своевременной диагностики и осуществление карантинных мероприятий.

Современный подход в лабораторной диагностике вируса Эбола сочетает в себе обнаружение вирусной РНК с использованием классической ОТ-ПЦР, а также обнаружение специфических вирусных антител в плазме (сыворотке) крови методом иммуноферментного анализа [4, 5].

При разработке иммунодиагностических препаратов к высоко патогенным вирусам в настоящее время большое значение придается использованию биотехнологических методов, позволяющих получать антигены и антитела искусственным путем. Это исключает необходимость работы с высоко контагиозным возбудителем, является экономически более выгодным и технологичным.

**Целью** данного исследования явилось получение векторной конструкции, обеспечивающей экспрессию рекомбинантного полипептида, включающего антигенные детерминанты нуклеокапсидного белка вируса Эбола, в прокариотической системе *E. coli*, штамм BL 21 (DE3).

**Материалы и методы.** В качестве исходного материала в работе использован вирус Эбола, штамм Zair, полученый из специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ.

Топологический анализ аминокислотной последовательности нуклеокапсидного белка вируса Эбола с целью поиска антигензначимых участков был проведен с использованием авторской компьютерной программы wxGeneBee. За основу в данной программе взяты шкалы гидрофобности и гидрофильности, предложенные Hopp and Woods (1981) и Kyte and Doolitle (1982), в критерии оценки входят такие параметры, как растворимость, заряд, удаленность от NC-остова, наличие спиралей, наличие сульфгидрильных остатков.

***Выделение вирусной РНК.*** В качестве исходного материала для выделения РНК вируса Эбола была использована вируссодержащая культуральная жидкость. Выделение РНК осуществляли с помощью коммерческого набора реагентов NucleoSpin RNA (MACHERY-Nagel) согласно прилагаемой инструкции.

Олигонуклеотидные последовательности для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего антигензначимые участки нуклеокапсидного белка вируса Эбола EB_F_HindIII (прямой) 5'-GCGCAAGCTTAATGATGACGACAAT-3' и EbolR2 (обратный) 5'-CGGGATCCCTGATGATGTTGCAG-3', были подобраны с использованием программы Vector NTI и искусственно синтезированы в ОДО Праймтех, Беларусь.

***Постановка реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).*** Постановку реакции обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-L», производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Российская Федерация, согласно прилагаемой инструкции. Полученную комплементарную ДНК (кДНК) использовали для постановки ПЦР. Состав реакционной смеси: по 25 пмолей праймеров EB_F_HindIII, EbolR2, 5 мкл 10x Taq-буфера (Праймтех, Беларусь), 4 мкл 25mM $MgCl_2$, 1 мкл дНТФ (10 мМ каждого), 10 мкл ОТ-продукта (кДНК), 2,5 ед. Taq-полимеразы (Праймтех, Беларусь), деионизованной воды до конечного объема 50 мкл. Режим амплификации: 94°C — 2 мин; 94°C — 15 с, 55°C — 45 с, 72°C — 1 мин, количество циклов — 35.

Анализ фрагментов ДНК, синтезированных в ПЦР, проводили методом электрофореза в 1,5–2% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 в/см в трис-ацетатном буфере, pH 8,0. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ.

Лигирование фрагментов ДНК проводили в объеме 20 мкл при температуре +22°C в течение часа. В качестве лигирующего фермента использовали T4 DNA Ligase (Fermentas, Литва) согласно прилагаемой инструкции.

Подготовку компетентной клеточной культуры, трансформацию клеток плазмидной ДНК проводили согласно методикам, описанным ранее [6].

Выделение рекомбинантной плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора реагентов QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) согласно прилагаемой инструкции.

Рестрикцию рекомбинантной ДНК проводили при 37°C в течение 2 ч соответствующими ферментами рестрикции по 1 U каждого в конечном объеме 20 мкл. После инкубации ферменты рестрикции инактивировали в течение 15 мин при 65°C.

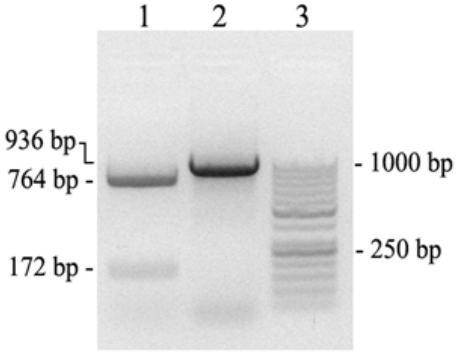
Анализ экспрессии рекомбинантного полипептида электрофорезом в полиакриламидном геле осуществляли согласно методу, предложенному Laemmli [7].

**Результаты и их обсуждение.** Для получения векторной конструкции, обеспечивающей экспрессию рекомбинантного полипептида, первоначально был проведен топологический анализ аминокислотной последовательности нуклеокапсидного белка вируса Эбола. В результате было выявле-

но наличие шести антигенных детерминант, преимущественно расположенных в С-концевой части молекулы белка. Для создания рекомбинантного полипептида нами была выбрана последовательность с 434 по 740 аминокислотное основание, включающая все шесть антигенных детерминант.

Для синтеза ДНК-фрагмента, кодирующего соответствующую аминокислотную последовательность, нами была подобрана пара олигонуклеотидов (праймеров), в структуру которых были дополнительно введены сайты узнавания для специфических рестриктирующих эндонуклеаз *HindIII* и *BamHI*, необходимые для последующего клонирования фрагмента в полилинкер плазмидного вектора.

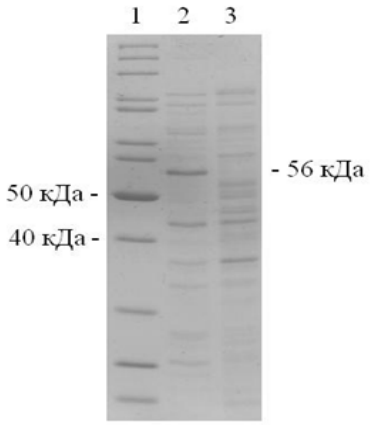
В результате постановки ОТ и последующей ПЦР на РНК-матрице был синтезирован фрагмент ДНК размером 936 пар нуклеотидных оснований (п.о.) (рисунок 1, дорожка 2). Оценку специфичности полученного кДНК-фрагмента осуществляли методом рестрикционного анализа по наличию уникального сайта узнавания для специфической рестриктирующей эндонуклеазы Xba I (рисунок 1, дорожка 1). Из рисунка видно, что в результате гидролиза рестриктазой Xba I ДНК-фрагмента, синтезированного на РНК-матрице вируса Эбола, произошло расщепление на два специфических участка ДНК размерами 764 и 172 п.о. Полученные данные согласуются с данными теоретических расчетов и обусловлены наличием сайта узнавания для соответствующей рестриктирующей эндонуклеазы в полученной нами ДНК-последовательности.




Дорожки: 1 — рестрикция фрагмента амплификации по сайту узнавания для рестриктазы Xba I; 2 — амплифицированный фрагмент ДНК; 3 — ДНК маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder.
Рисунок 1 — Электрофоретический анализ продукта амплификации на матрице РНК вируса Эбола и оценка его специфичности

Для создания гибридного плазмидного вектора, способного обеспечить экспрессию рекомбинантного полипептида, полученный ДНК-фрагмент и исходный вектор pJC40 [8] были последовательно обработаны рестриктирующими эндонуклеазами *HindIII* и *BamHI* и лигированы. Полученной лигазной смесью были трансформированы компетентные клетки *E.coli*, штамм *Dh5α*. Клетки выращивали на твердой селективной питательной среде, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. После инкубации в течение ночи при 37ºС отдельные колонии клеток рассевали штрихом и выращивали при тех же условиях. Дальнейшее выделение рекомбинантной плазмидной ДНК и последующая ее обработка соответствующими рестриктазами позволили произвести селекцию клеточных клонов, несущих гибридную плазмиду pJC40/*NP EBO*.

На последующих этапах исследования полученной гибридной плазмидой были трансформированы пермиссивные компетентные клетки *E. coli*, штамм *BL21(DE3)*. Для экспрессии рекомбинантного полипептида трансформанты выращивали на жидкой питательной среде LB, содержащей 0,2% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, в момент достижения бактериальной культурой оптической плотности $OD_{600}$=0,3 осуществляли индукцию биосинтеза рекомбинантного полипептида путем внесения в среду изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до конечной концентрации 0,4 mM, после чего клетки инкубировали ещё в течение 3,5 ч. Клетки осаждали центрифугированием и обрабатывали лизирующим буфером. Уровень экспрессии рекомбинантного полипептида оценивали электрофорезом в 12% полиакриламидном геле (рисунок 2). Из рисунка видно, что по сравнению с контрольным образцом, в качестве которого использовался лизат бактериальнх клеток (дорожка 3), в лизате клеток, содержащем рекомбинантную плазмиду pJC40/ *NP EBO*, наблюдается экспрессия полипептида с рассчитанной молекулярной массой 56 кДа (дорожка 2).




Дорожки: 1 — маркерные белки; 2 — лизат клеток *E.coli*, штамм *BL21*, экспресссирующих рекомбинантный полипептид вируса Эбола; 3 — лизат клеток *E.coli*, штамм *BL21*
Рисунок 2 — Электрофоретический анализ рекомбинантного полипептида вируса Эбола, синтезирующегося под контролем рекомбинантной плазмиды pJC40/*NP EBO*. в клетках *E. coli*, штамм *BL21(DE3)*

В результате исследований с использованием методов генетической инженерии получена гибридная векторная конструкция pJC40/*NP EBO*, обеспечивающая экспрессию рекомбинантного белка вируса Эбола в прокариотической системе *E. coli*, штамм *BL21(DE3)*. На последующих этапах исследования предполагается оценить антигенную активность полученного рекомбинантного полипептида и перспективу его использования в качестве основного вирусного антигена в диагностических тест-системах.

**Литература**

1. Ebola virus ecology: a continuing mystery / H. Feldmann [et al.] // Trends in Microbiology. — 2004. — Vol.12, № 10. — P. 433–437.

2. Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic / J.M. Morvan [et al.] // Microbes Infect. — 1999. — № 1. — P. 1193–1201.

3. Approaches toward studies on potential reservoirs of viral haemorrhagic fever in southern Sudan (1977) / A.A. Arata [et al.] // Ebola virus haemorrhagic fever. — Amsterdam: Elsevier, 1978. — P. 191–200.

4. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses / A. Sanchez [et al.] // Fields virology. — Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. — P. 1409–1448.

5. Filoviruses and arenaviruses / J.E. Strong [et al.] // Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology. — 7th ed. — Herndon, Virginia, 2006. — P. 774–790.

6. Антигенные свойства рекомбинантного полипептида, содержащего повторы антигенной детерминанты нуклеокапсидного белка вируса гепатита С / П.А. Семижон [и др.] // Здравоохранение. — 2006. — № 11. — С. 35–37.

7. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.

8. Clos, J. pJC20 and pJC40- two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in Escherichia coli / J. Clos, S. Brandau // J. Protein Expres. Purificat. — 1994. — Vol. 5. — P. 133–137.

## A VECTOR DESIGN, WHICH ENSURES THE EXPRESSION OF DIAGNOSTICALLY SIGNIFICANT RECOMBINANT POLYPEPTIDE OF EBOLA VIRUS

**Semizhon P.A., Scheslenok E.P., Shkolina T.V., Fomina E.G., Vladyko A.S.**

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

Hybrid vector pJC40/NP EBO for expression of recombinant polypeptide in procaryotic system E. coli strain *BL21(DE3)* was constructed. As result, the truncated nucleocapsid polypeptide of the Ebola virus with MW 56 kDa was produced.

At subsequent stages of the study is expected to evaluate the antigenic activity of the recombinant polypeptide and the prospect of its use as the main viral antigen in the diagnostic test systems.

**Keywords:** Ebola virus, specificity of DNA amplified fragment, hybrid plasmid, recombinant polypeptide.

Поступила 02.09.2013

# ДЕТЕКЦИЯ МЕТОДОМ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ МУТАЦИЙ В 90 И 91 КОДОНАХ *GYRA* ГЕНА, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФТОРХИНОЛОНАМ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

**Слизень В.В.**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Выявление у *M. tuberculosis* мутаций, ассоциированных с резистентностью к фторхинолонам, влечет за собой пересмотр схемы антибиотикотерапии пациентов. Для более достоверного подтверждения присутствия мутаций могут быть использованы последовательно несколько молекулярно-генетические методов, в т. ч. основанных на анализе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В работе показано, что рестриктазы *BstUI*, *MluI*, *TaqI* приводят к образованию профилей фрагментов, которые различаются у *M. tuberculosis* с мутациями и без мутаций в 90 и 91 кодонах *gyrA* гена. ПЦР-ПДРФ анализ с использованием рестриктаз *BstUI*, *MluI*, *TaqI* может применяться для идентификации мутаций в *gyrA* гене в кодонах 90 или/и 91, что позволяет идентифицировать устойчивые к фторхинолонам *M. tuberculosis*.

**Ключевые слова:** экспресс-диагностика, устойчивость к фторхинолонам, туберкулез.

Беларусь входит в число 18 стран с высоким уровнем заболеваемости туберкулезом. Всемирная организация здравоохранения к одним из приоритетных направлений относит снижение заболеваемости туберкулёзом с последующей его ликвидацией. Один из факторов успеха — быстрая диагностика этого заболевания, распространение которого обусловлено формированием множественно или широко лекарственно устойчивых *M. tuberculosis*. Ранняя диагностика широко лекарственно устойчивого туберкулеза позволяет своевременно скорректировать терапию и увеличить шанс пациента на благоприятный исход заболевания. Определение спектра резистентности к противотуберкулезным лекарственным средствам с использованием классических методов занимает до 3 мес., что диктует необходимость разработки методов экспресс диагностики лекарственно устойчивых *M.tuberculosis*. Устойчивость к фторхинолонам у изолятов *M. tuberculosis* связана с мутациями в 21 п.о. фрагменте *gyrA* гена. Согласно публикациям, в разных географических регионах доминирующие мутации в этом гене локализуются в 90, 91 и 94 кодонах; они встречаются у 60–90% *M. tuberculosis*, проявляющих фенотипическую устойчивость к фторхинолонам, что позволяет рассматривать эти кодоны как маркеры резистентности к фторхинолонам и как индикаторы широкой лекарственной устойчивости микобактерий [1]. Кодон 90 характеризуется присутствием GCG в положениях 268, 269, 270 соответственно. Мутация, происходящая в этом кодоне, как правило, однотипна, находится в положении 269 и приводит к замене GCG на GTG, сопровождающейся изменением кодируемой аминокислоты с аланина на валин. Кодон 91 характеризуется присутствием нуклеотидов TCG в положениях 271, 272, 273 соответственно. Мутация, происходящая в положении 271, сопровождается заменой TCG на CCG, что приводит к замене кодируемой аминокислоты с серина на пролин. В связи с тем, что выявление мутаций, ассоциированных с резистентностью к фторхинолонам, влечет за собой пересмотр схемы антибиотикотерапии пациентов, то для более достоверного подтверждения присутствия мутаций может быть использовано последовательно несколько молекулярно-генетических методов, в т. ч. основанных на анализе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, что увеличивает достоверность получаемых результатов.

**Цель:** провести оценку возможности использования метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов для выявления мутаций в 90, 91 кодонах. Для этого изучена способность рестриктаз *BstUI*, *MluI*, *TaqI* выявлять микобактерии с мутациями в этих кодонах.

**Материалы и методы.** Исследования проведены в рамках задания ГНТП «Разработать тест-систему для молекулярной экспресс-идентификации и мониторинга лекарственной устойчивости к противотуберкулезным лекарственным средствам резервного ряда (фторхинолонам) при множественно лекарственно-устойчивом туберкулезе».

Были исследованы 90 культур микобактерий: *M. tuberculosis* (n=84), *M. chelonae* (n=1), *M. gordonae* (n=4), *M. fortuitum* (n=1). Определение устойчивости к офлоксцину проводили методом абсолютных концентраций (МИК = 2 мкг/мл). Детекцию мутаций осуществляли с помощью GenoType MTBDRsl (HAIN, Germany), секвенирования (проведено на приборе AbiPRISM 310, Applied Biosystems, n=16) и ПЦР с гидролизными пробами [2].

***ПЦР.*** Экстрагировали ДНК микобактерий путем нагревания суспензии МБТ при 98°С в течение 20 мин в 5% Chelex-100 и 1xTAE буфере с последующим центрифугированием 13000 g — 20 мин. Фрагменты размером 320, 194, 150 п.о. *GyrA* гена у устойчивых и чувствительных к офлоксацину изолятов микобактерий амплифицировали с помощью праймеров: 320-GyrA-F (CAGCTACATCGACTATGCGA) и 320-GyrA-R(GGGCTNCGGTGTACCTCAT), GyrF 180-198/194(CGATTCCGGCTTCCGCCCG) и GyrR374-353 (CGGTGGGTCATTGCCTGGCG) в iQ5 термоциклере (Bio-Rad). ПЦР проводили с использованием реакционных смесей объемом 50 мкл, содержащих: 1xPCR буфер с $(NH_4)_2SO_4$,1.5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ каждого дНТФ, 1,25 ед. Taq-полимеразы (ОАО "Праймтех"), по 20 пкмолей каждого праймера, 6–10 мкл образца ДНК. Режим амплификации был следующим: 95°С — 5 мин, 38 циклов (95°С — 35 с, 60°С — 40 с и 72°С — 50 с). ПЦР-продукты визуализировали гель электрофорезом (100 мАm — 60 мин) в 1.5% агарозном геле и 1x TAE буфере.

***Рестрикция.*** ПЦР-продукты (по 12 мкл), которые образовались в процессе амплификации gyrA, вносили в рестрикционный коктейль общим объемом 25 мкл, содержащий 2.5 мкл буфера для рестриктазы и 10 мкл деионизованной воды. В рестрикционные смеси вносили *TaqI*, *BstUI*, *MluI* рестриктазы по 5 ед. (проводили три независимые рестрикции). Содержимое пробирок тщательно перемешивали пипетрированием. Пробу с *TaqI* рестриктазой инкубировали при 60°С — 2,5 ч, после чего открыв крышки рестрикционную смесь выпаривали при 80°С — 20 мин так, чтобы ее объем составил 12–16 мкл. Пробу с *BstUI* и *MluI* рестриктазой инкубировали при 37°С — 2,5 ч с последующей инактивацией-выпариванием при 65°С в течение 20–25 мин. Весь объем рестрикционной смеси подвергали электрофорезу (режим — 70 мА, 140 В) в 3% агарозном геле (содержание бромида этидия в геле 0,5 мкг/мл) и 1xTAE буфере. Профили рестрикции визуализировали в трансиллюминаторе. Получаемые результаты могут быть проанализированы визуально, либо с помощью программного обеспечения, предназначенного для анализа электрофоретических гелей.

**Результаты и их обсуждение.** ***Детекция мутаций в 90 кодоне gyrA гена.*** Кодон 90 характеризуется присутствием GCG в положениях 268, 269, 270 соответственно. Мутация происходит в положении 269 и сопровождается заменой GCG–GTG. Рестриктаза *BstUI* cg|cg распознает немутировавший кодон 90 и проводит рестрикцию этого сайта. Появление мутации в кодоне 90 сопровождается потерей сайта рестрикции. С целью подтверждения присутствия мутации, сопровождающейся заменой цитозина на тимин в положении 269 *gyrA* гена *M. tuberculosis*, проводили рестрикцию с помощью *BstUI* cg|cg ампликонов *gyrA* гена размером 320, 320+194 и 150 п.о., в результате которой изоляты с мутантным и «диким» кодоном образовывали отличающиеся друг от друга профили фрагментов, что позволяет использовать рестрикцию с помощью *BstUI* cg|cg для идентификации мутации ALA90VAL (рис.1). Рестрикция одновременно двух ампликонов *gyrA* гена размером 320 п.о. и 194 п.о. приводит к формированию у мутантных и немутантных изолятов патернов фрагментов с более выраженными отличиями.

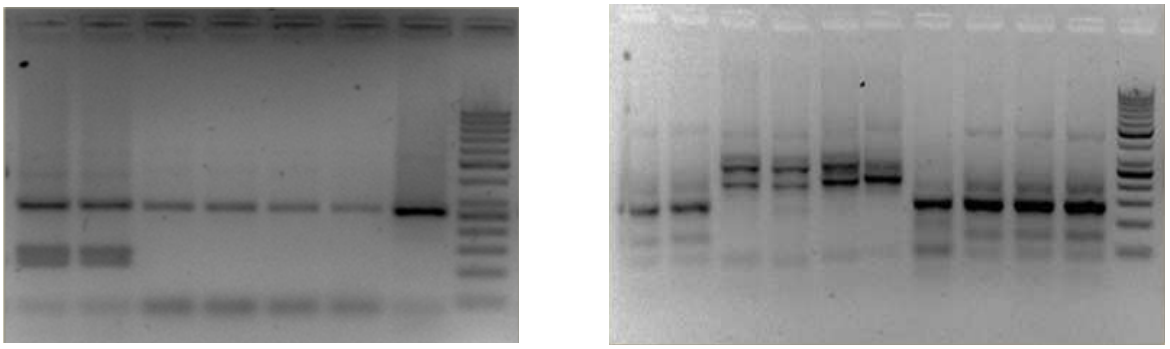



Рисунок 1 — Патерн рестрикционных фрагментов у изолятов с мутациями ALA90VAL (треки 1, 2, 11–14) и без мутаций в 90 кодоне (треки 3–7 и 9, 10, 15–18), образуемых *BstUI* cg|cg (А — рестрикция *gyrA* размером 320 п.о.; В — рестрикция 320+194 п.о. *gyrA*)

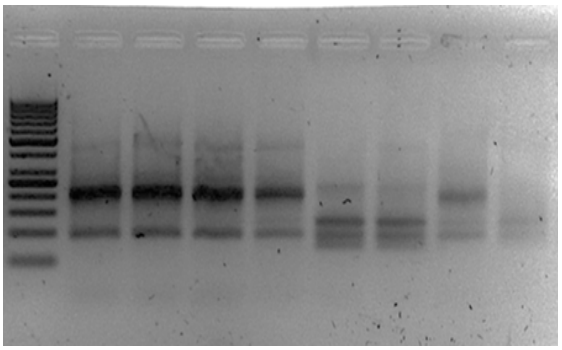
***Детекция мутаций в 91 кодоне gyrA гена.*** Кодон 91 характеризуется присутствием TCG в положении 271, 272, 273. Согласно данным литературы и полученным данным секвенирования бело-

русских изолятов, доминантной мутацией в этом кодоне является замена TCG на CCG, которая приводит к миссенс-мутации серин-пролин.

Рестриктаза *TaqI* t↓cga распознает немутировавший кодон 91 и проводит рестрикцию в этом сайте. Появление мутации в кодоне 91, которая сопровождается заменой TCG–CCG, приводит к исчезновению сайта рестрикции *TaqI* t↓c g a, и как следствие этого рестрикция в этом сайте не происходит, и как следствие этого профили рестрикционных фрагментов микобактерий туберкулеза с мутантным и немутантным 91 кодоном отличаются друг от друга (рисунок 2).

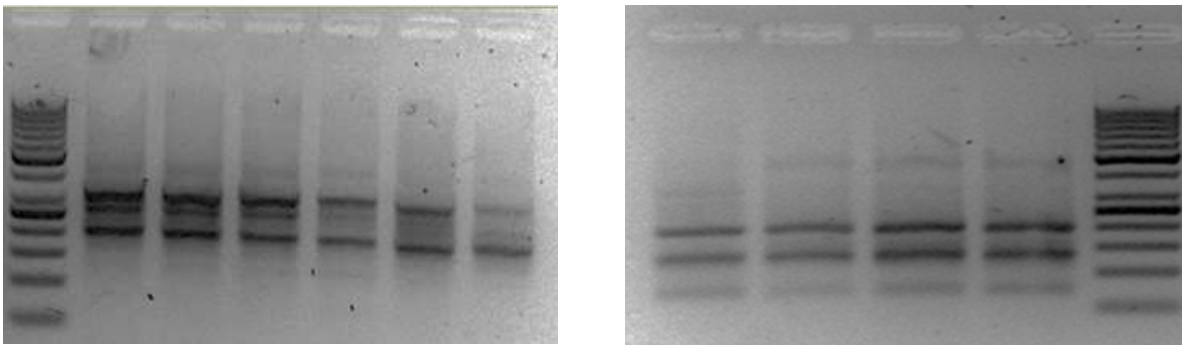
***ПЦР-ПДРФ для одновременного определения мутаций в 90 и 91 кодонах.*** Рестриктаза *MluI* с сайтом распознавания A\CGCGT способна распознавать изменения в 90 и 91 кодонах. Было установлено, что при использовании *MluI* профили фрагментов у мутантных и немутантных штаммов отличаются, при этом у изолятов с мутациями рестрикция этим ферментом не происходит, в то время как у микобактерий туберкулеза с диким генотипом рестрикция происходит (рисунок 3). Таким образом рестрикция с помощью *MluI* может быть удобным методом для одновременного определения мутаций в кодонах 90 и 91.

Таким образом, рестриктазы *BstUI*, *MluI*, *TaqI* приводят к образованию профилей рестрикционных фрагментов, которые отличаются у *M. tuberculosis* с мутациями в 90 и 91 кодонах и без них. ПЦР-ПДРФ анализ с помощью рестриктаз *BstUI*, *MluI*, *TaqI* может использоваться для идентификации мутаций в *gyrA* гене в кодонах 90, 91, что позволяет выявить устойчивость к фторхинолонам у *M. tuberculosis*.



1 2 3 4 5 6 7 8

Рисунок 2 — Патерн рестрикционных фрагментов у изолятов с мутациями SER91PRO (треки 1, 2, 11–14) и без мутаций в 91 кодоне (треки 3–7 и 9, 10, 15–18), образуемых рестриктазой *TaqI* (трек 1 — ДНК-лестница, 50 п.о.)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Рисунок 3 — Патерны рестрикционных фрагментов у изолятов с мутациями SER91PRO (треки 1, 2, 3,4) и ALA90VAL (треки 5, 6) и без мутаций (ALA90, SER91) в 90 и 91 кодоне, образуемых рестриктазой *MluI* (трек 1, 11 — ДНК-лестница, 50 п.о.)

**Литература**

1. Maruri, F. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system / F. Maruri, T.R. Sterling, A.W. Kaiga [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2012. — Vol. 67, № 4. — P. 819–832.

2. Молекулярная экспресс-идентификация и мониторинг устойчивости к противотуберкулезным лекарственным средствам резервного ряда (фторхинолонам) при множественно-лекарственно-устойчивом туберкулезе / В.В. Слизень [и др.] // Рецепт. — 2013. — № 2. — С. 83–94.

## DETECTION OF FLUOROQUINOLONES RESISTANCE MUTATIONS IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY PCR-RFLP METHOS

**Slizen V.V.**

*Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus*

A single nucleotide polymorphism in codons 90, 91, 94 of *gyrA* gene, associated with the resistance to FQ in MTB, can be detected by variety of methods. Mutations in codons 90 and 91 of *gyrA* gene of MTB can be identified by PCR-RFLP method. Restriction enzymes *BstUI*, *MluI*, *TaqI* was shown to generate patterns of fragments that differs in *Mycobacterium tuberculosis* with and without mutations in codons 90 and 91. PCR-RFLP with these endonucleases can be applied for identification isolates with mutations at codons 90, 91 of *gyrA* gene.

**Keywords:** express-diagnostics, resistance to fluoroquinolones, tuberculosis.

Поступила 04.09.2013

## ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРОНЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ У ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОВ

**Слизень В.В., Циркунова Ж.Ф., Гудкова Е.И., Скороход Г.А., Глаз О.Ч.**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** При исследовании резистентности сальмонелл (200 культур) к β-лактамным антибиотикам установлено, что 24 штамма проявляли устойчивость к β-лактамным антибиотикам. Изучена распространенность генетических детерминант резистентности к β-лактамным антибиотикам у сальмонелл — генов ТЕМ, ОХА, АСС. Показано, что у трех изолятов *S.Typhimurium* был выявлен ген ОХА, у одного — PSE-1, у шести устойчивых к β-лактамным препаратам *S. Enteritidis* был выявлен ген ТЕМ. Было установлено, что у сальмонелл, проявивших устойчивость к цефалоспоринам, присутствовали гены blaACC.

**Ключевые слова:** устойчивость к бета-лактамным антибиотикам, сальмонеллезы.

**Введение.** Эволюция мира микробов в течение последнего столетия характеризовалась необычайно высокими темпами. Ее особенностью являлось приобретение и совершенствование генетических механизмов резистентности к факторам внешней среды антропогенного происхождения. Наиболее сильное воздействие на эволюцию условно-патогенных и патогенных для человека микроорганизмов оказала разработка и широкое применение в медицине и сельском хозяйстве антибиотиков.

Сальмонеллез — одна из самых распространенных острых кишечных инфекций бактериальной этиологии, которая имеет повсеместное распространение и является актуальной проблемой для большинства стран мира, что обусловлено высоким уровнем заболеваемости, трудностями в эпидемиологическом расследовании, формированием резистентности к противомикробным препаратам, отсутствием эффективной специфической профилактики.

Повсеместно в мире регистриуют *S. enterica*, проявляющие устойчивость к противомикробным химиопрепаратам — β-лактамам, тетрациклинам, сульфаниламидам. К основным механизмам устойчивости бактерий к β-лактамным антибиотикам относятся: продукция β-лактамаз [1, 2], нарушение проницаемости наружной мембраны [3], модификация мишени (пенициллинсвязывающих белков — ПСБ) [4], активное выделение антибиотика из клетки (система эффлюса) [5]. Создание и применение в медицинской практике большого количества β-лактамных антибиотиков привело к тому, что количество только известных β-лактамаз превысило 300 [6]. Благодаря плазмидной лока-

лизации генов распространение этих ферментов среди возбудителей инфекционных болезней человека приняло угрожающий характер [7]. В настоящее время цефалоспориновые антибиотики, прежде всего представители III поколения, прочно удерживают одно из лидирующих положений в лечении широкого круга тяжелых инфекций, вызываемых грамотрицательными микроорганизмами. В последнее время появляются сообщения о *Salmonellas spp.*, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра действия, что является наблагоприятной тенденцией из-за устойчивости этих изолятов к цефалоспоринам, которые являются препаратами выбора в терапии сальмонеллезов у детей.

Среди нетифоидных сальмонелл штаммы, продуцирующие β-лактамазы расширенного спектра действия, встречаются достаточно редко, преимущественно они принадлежат к семействам blaTEM или blaSHV, но могут встречаться ферменты из групп blaCTX, blaCMY и blaOXA, описаны штаммы с β-лактамазами ACC-1. Важной особенностью БЛРС является трудность их фенотипической детекции в рутинной практике. Стандартные клинические методы определения БЛРС позволяют только оценить факт наличия фермента. Поэтому все большее значение приобретает молекулярно-генетические методы исследования β-лактамаз, основанные на анализе локализации генов (3-лактамаз, сравнении их аминокислотных последовательностей и четвертичных структур этих ферментов [6].

**Цель** работы: охарактеризовать фенотип и генотип устойчивости к β-лактамным антибиотикам *Salmonella spp.* — возбудителей сальмонеллезов. Оценить распространенность генетических детерминант резистентности к β-лактамным антибиотикам у сальмонелл — генов TEM, OXA, ACC, PSE-1.

**Материалы и методы.** Исследовали 200 культур сальмонелл (*Enteritidis* — 148 штаммов, *Typhimnrium* — 21, *London* — 6, *Derby* — 9, *Branderburg* — 3, *Agama* — 1, *Choleraesiris* — 3, *Virchow* — 2, *Haifa* — 1, *Infantis* — 3, *Maenster*— 1, *Reading* — 1, *Weltevreden* — 1), изолированных от пациентов, проходивших лечение в детской и взрослых Городских инфекционных больницах г. Минска. Сальмонеллы культивировали на среде Эндо и Левина при температуре 37°C в течение 18–24 ч.

Селекцию устойчивых к β-лактамным препаратам штаммов проводили на основании дискодиффузионного метода с последующим определением профилей устойчивости в автоматическом анализаторе Vitek (Vitek, bioMerieux, Франция).

Экстракцию бактериальной ДНК проводили путем инкубации 16–20-часовой чистой культуры сальмонелл при 98°C в течение 10 мин в 5% суспензии Chelex-100 в lxTAE буфере с последующим центрифугированием 13000 g — 10 мин. Исследовали супернатант.

У резистентных к β-лактамным антибиотикам сальмонелл проводили детекцию β-лактамаз классов TEM, SHV, CMY, OXA, ACC, для чего использовали праймеры и режими амплификации, указанные в таблице 1.

Таблица 1 — Детекция детерминант резистентности к β-лактамным препаратам: праймеры, размер ампликонов, праметры стадии элонгации

| № п/п | Ген | Порядок | Праймер | Размер ампликона, п.о. | Стадия элонгации |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | OXA-1 | прямой | AGCAGCGCCAGTGCATCA | 708 | 60°C — 1 мин |
| 2 | OXA-2 | обратный | ATTCGACCCCAAGTTTCC | | |
| 3 | SHV-1 | прямой | CCCTGTTAGCCACCCTGCCG | 829 | 65°C — 1 мин |
| 4 | SHV-2 | обратный | CGTTGCCAGTGCTCGATCAGC | | |
| 5 | PSE1-1 | прямой | CGCTTCCCGTTAACAAGTAC | 419 | 60°C — 1 мин |
| 6 | PSE1-2 | обратный | CTGGTTCATTTCAGATAGCG | | |
| 7 | TEM-F | прямой | GTATTCAACATTTCCGTGTCG | 854 | 60°C — 1 мин |
| 8 | TEM-R | обратный | CCAATGCTTAATCAGTGAGGC | | |
| 9 | ACCblaF | прямой | AGCCTCAGCAGCCGGTTAC | 818 | 65°C — 45 с |
| 10 | ACCblaR | обратный | GAAGCCGTTAGTTGATCCGG | | |
| 11 | CMY-2-F | прямой | CTGCGCTCTGCTGCTGACAGC | 1093 | 60°C — 1 мин |
| 12 | CMY-2-R | обратный | CTCGACACGGACAGGGTTAGG | | |

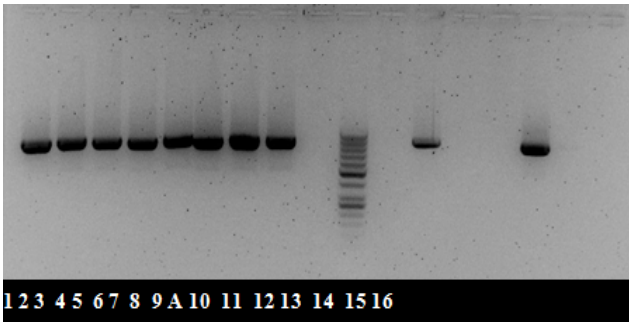
Сокращения используемые при описании фенотипа устойчивости сальмонелл: AMP — ампициллин, SAM — ампициллин+сульбактам, PIP — пиперациллин, CZO — цефазолин, CAZ — цефтазидим, AMK — ампициллин+клавулановая кислота, GEN — гентамицин, TOB — тобрамицин, NIT — нетилмицина, CIP — ципрофлоксацин, LVX — левофлоксацин, CXM — цефуроксим.

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала: 1х ПЦР буфер с $(NH_4)_2SO_4$, $MgCl_2$ — 1,5 мМ, каждого дНТФ — по 2 мМ, Taq-полимераза — 1,25 ед, праймер — 20 пкМ, образец ДНК — 6–10 мкл.

Наличие продуктов амплификации выявляли электрофорезом: в 1,5% агарозный гель содержащий бромид этидия (0,5 мкг/мл) вносили по 16 мкл образцов; параметры электрофореза — 200 В, 100 мА, 1 ч.

**Результаты и их обсуждение.** При исследовании резистентности сальмонелл (200 культур) к β-лактамным антибиотикам установлено, что 24 штамма *S. Enteritidis* проявляли устойчивость к одному из β-лактамных антибиотиков. Устойчивость к β-лактамам у сальмонелл может быть связана с генами TEM. Первым охарактеризованным ферментом TEM типа была пенициллаза TEM-1, выделенная из *E. coli* [8]. В настоящее время уже описано более 170 представителей фермента данного типа и их количество постоянно растет. Первичная структура TEM-1 включает 288 аминокислотных остатков. Все описанные производные β-лактамаз TEM типа являются вариантами β-лактамаз TEM-1 и отличаются от исходного фермента единичными аминокислотными заменами (от одной до семи). В настоящее время мутации найдены в 60 положениях [9]. Бета-лактамазы SHV типа были обнаружены вторыми после ферментов TEM типа. В настоящее время имеется информация о 126 аллельных вариантах β-лактамаз SHV типа.

В процессе амплификации гена TEM у изученных культур сальмонелл в положительных случаях образовывались ампликоны размером 854 п.о. Культуры *S. Enteritidis* 6069, 2730, 2482, 3996, 6928 были позитивны по этому гену (рисунок 1). Ген blaTEM выявляли у штаммов с устойчивостью к ампициллину (таблица 2).




Треки 1–16 — *S. Enteritidis* 6069, 6069, 2730, 5334, 2730, 5334, 2482, 2482, 2884, 4459, 2884, 4459, 2884, 2884, 2533, 2533; A — маркер молекулярного веса 50 п.о.

Рисунок 1 — Результаты амплификации TEM гена

Также у сальмонелл, проявлявших устойчивость к β-лактамным препаратам (цефалоспоринам), выявлен ген blaACC (рисунок 2).

У сальмонелл blaOXA обеспсчивают устойчивость к ампициллину ингибируются клавуланавой кислотой. Некоторые blaOXA обеспечивают вость к цефтазидиму, OXA-17 к цефотаксиму и цефепиму. Несколько вариантов blaOXA гена были идентифицированы у *Salmonella spp.*, которые преимущественно принадлежат к группе blaOXA-1, включающей blaOXA-1, blaOXA-4, blaOXA-30, blaOXA-31, blaOXA-47 гены, и группе blaOXA-2, включающей гены blaOXA-2, blaOXA-3, blaOXA-15, blaOXA-32, blaOXA-34 и blaOXA-53.

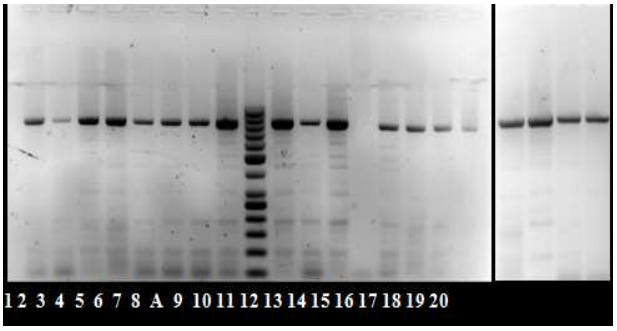
Изучение присутствия генов OXA и PSE-1 у белорусских изолятов сальмонелл показало, что в положительных случаях у сальмонелл с OXA образовывались ампликоны размером 708 п.о. Штаммы *S.Typhimurium* 54, 65, 2804 были положительны по гену OXA.

В случае присутствия гена PSE1 у изолятов сальмонелл образовывались ампликоны размером 419 п.о. Амплификация штаммов сальмонелл позволила выявить этот ген у одной культуры *S. Typhimurium* 10062, имеющей интегрон 1 в составе своего генома.

Таблица 2 — Результаты изучения свойств сальмонелл, проявляющих устойчивость к препаратам β-лактамного ряда

| № штаммов | Серовар | Источник | Фенотип устойчивости* | Гены |
|---|---|---|---|---|
| 5334-1 | *Enteritidis* | Больной | AMP-SAM-PIP-CZO-CAZ-AMK-GEN-TOB-NIT | ACC, TEM |
| 5461-1 | *Enteritidis* | Больной | AMP-SAM-PIP-CZO-CAZ-AMK-GEN-TOB-CIP(i)-LVX(i)-NIT | ACC, TEM |
| 6891-1 | *Enteritidis* | Больной | AMP-SAM-CZO-AMK-GEN-TOB-NIT | ACC, TEM |
| 2482-1 | *Enteritidis* | Больной | AMP-PIP(i)-CZO-CXM-GEN-TOB-NIT | ACC, TEM |
| 2730-1 | *Enteritidis* | Больной | AMK-PIP-CZO-CXM-GEN-TOB-NIT | ACC |
| 17756-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM-GEN-TOB-NIT | ACC |
| 5089-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-AMK-GEN-TOB-NIT | ACC |
| 4927-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-AMK- GEN-TOB-NIT | - |
| 5089-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-AMK- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 6069-1 | *Enteritidis* | Больной | AMP-SAM(i)-CZO-AMK- GEN-TOB-NIT | ACC, TEM |
| 6884-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-AMK- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 9985-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-AMK- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 16860-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-AMK- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 10120-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-AMK- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 2533-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 2749-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 2884-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 3996-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 4360-1 | *Enteritidis* | Больной | AMP(i)-PIP(I)-CZO-CXM-GEN-TOB-NIT | ACC, TEM |
| 4459-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 4595-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 6928-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 7162-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 7250-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |
| 8296-1 | *Enteritidis* | Больной | CZO-CXM- GEN-TOB-NIT | ACC |

Были проведены исследования сальмонелл на присутствие генов CTY и SHV, также обеспечивающих устойчивость к β-лактамам Ни одна из исследованных культур сальмонелл, проявлявших устойчивость к β-лактамным антибиотикам, не обладала этими генетическими детерминантами.




Треки 1–20 — *S. Enteritidis* 21 9985, 6069, 884, 4459, 2730, 5334, 2884, 5089, 10120, 2482, 2533, 4927, 17756, 8296, 2749, 4360, 3996, 6928, 7162, 16860; A — маркер ДНК 50 п.о

Рисунок 2 — Результаты определения blaACC у сальмонелл

Таким образом, в результате проведенных исследований была изучена генетическая гетерогенность сальмонелл по генам резистентности к β-лактамным препаратам. Установлено, что у сальмонелл, проявивших устойчивость к цефалоспоринам, присутствовали гены blaACC, а у проявивших устойчивость к ампицилину — гены blaTEM. У всех культур сальмонелл были выявлены гены OXA и PSE-1.

**Литература**

1. Massova, I. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases / I. Massova, S. Mobashery // Antimicrob. Agents Chemother. — 1998. — Vol. 48, № 1. — P. 17–25.

2. Ghuysen, J.M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and ß-lactamases / J.M. Ghuysen // Trends Microbiol. — 1994. — Vol. 2. — P. 372–380.

3. James, P.A. Bacterial resistance to cephalosporins as a function of outer membrane permeability and access to their target / P.A. James, D.S. Reeves // J. Chemother. — 1996. — Vol. 8. — P. 37–47.

4. Chambers, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications / H.F. Chambers // Clin. Microbiol. Rev. — 1997. — Vol. 10. — P. 781–791.

5. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii / C. Heritier [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 2005. — Vol. 49. — P. 3198–3202.

6. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишкова // Успехи биологической химии. — 2004. — Т. 44. — С. 263–306.

7. Harada, S. Extended-spectrum β-Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy / S. Harada, I. Yoshikazu, Y. Keizo // Korean J. Lab. Med. — 2008. — Vol. 28. — P. 401–412.

8. Datta, N. Synthesis of R-plasmid-coded beta-lactamase in minicells and in an in vitro system / N. Datta, P. Kontomichalou // Nature. — 1995. — Vol. 208. — P. 239–241.

9. Рубцова, М.Ю. Ультипараметрическое пределение генов и точечных мутаций в них для идентификации бета-лактомаз / М.Ю. Рубцова, М.М. Уляшова // Успехи биологической химии. — 2010. — Т. 50. — С. 303–348.

## DETECION OF GENES OF RESISTANCE TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS IN NONTYPHOID SALMONALLA SPP

**Slizen V.V., Tsyrkunova Z.F., Gudkova E.I., Skorohod G.A., Glaz O.C.**

*Belarussian Stare Medical University, Minsk, Belarus*

The genetic mechanisms of resisance to beta-lactam antibiotics have been sudied in 200 isolates of nontyphoid *Salmonalla spp.* The prevalence of genes TEM, OXA, ACC among *Salmnella spp.* has been determined: three isolates of *S.Typhimurium* harbored oxa gene, one — PSE-1. Tem gene has been foundIn six isolates of *S. Enteritidis*, all these isolates was resistant to ampicillin. *S. Enteritidis* with the resistance to cephalosporins carried gene blaACC.

**Keywords:** resistance to beta-lactams, salmonella.

Поступила 04.09.2013

## ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ ПРЯМОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИУТРОБНЫХ ПНЕВМОНИЙ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ

**Соколова Е.А., Горовиц Э.С., Фрейнд Г.Г.**

*ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера», г. Пермь, Россия*

**Резюме.** Обсуждаются вопросы диагностики внутриутробных пневмоний вирусной этиологии. В результате комплексного вирусно-бактериального исследования 94 образцов ткани легких детей с внутриутробными летальными пневмониями в 73 случаях (77,7%) выявлено их инфицирование. В 58,9% образцах ткани легкого с помощью реакции прямой иммунофлуоресценции обнаружены антигены различных респираторных вирусов. При этом в 26% случаев они были выявлены в сочетании с бактериями. Среди различных видов вирусов преобладали респираторно-синциальные. Проведенный клинико-морфологический анализ показал, что вирусно-бактериальные пневмонии отличаются наиболее тяжелым течением и чаще приводят к летальному исходу в раннем неонатальном периоде.

**Ключевые слова:** внутриутробные пневмонии, вирусная этиология.

**Введение.** Возбудителями внутриутробных пневмоний, как известно, могут быть различные виды микроорганизмов, в т. ч. и вирусы [1–5]. При этом вирусные пневмонии, как правило, отличаются наиболее тяжелым течением. Детекция вирусов в патологическом материале обычно осуществляется с помощью иммунофлуоресцентного анализа. В последние годы с этой целью применяются и молекулярно-генетические методы, чаще полимеразная цепная реакция (ПЦР).

**Целью** исследования было изучение значимости вирусных патогенов в этиологии внутриутробных пневмоний, закончившихся летальным исходом.

**Материалы и методы.** По данным аутопсии проведен анализ частоты встречаемости внутриутробных пневмоний вирусной природы в Пермском крае в период с 2006 по 2012 гг. Диагноз внутриутробной пневмонии ставили на основании макро- и микроскопического исследования тканей

органов. Материалом служили образцы ткани легких (94) и селезенки (26). Их взятие осуществляли не позднее 12 ч с момента смерти ребенка. Материал забирали в стерильные пробирки с соблюдением правил асептики в виде 2–3 кусочков ткани органа величиной от 0,5 до 1 см, транспортировку проводили в течение ближайших 2 ч [6].

Реакцию прямой иммунофлуоресценции для индикации вирусных антигенов проводили традиционным методом. Использовали конъюгаты для определения различных видов респираторных вирусов: гриппа, парагриппа, аденовирусов и респираторно-синцитиального. Степень специфического свечения оценивали по общепринятой четырехкрестной шкале. Положительным считали уровень свечения не менее чем на три «+».

Параллельно осуществляли бактериологическое исследование для выявления основных групп бактерий. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили, главным образом, на основании учета биохимических свойств с использованием соответствующих тестов производства фирмы «Лахема» (Чехия). Исследован материал от 94 умерших детей.

**Результаты и их обсуждение.** В результате микробиологического исследования патологического материала в 73 образцах легочной ткани (77,7%) были выявлены различные патогены, в 22 из 26 (84,6%) образцах обнаружена микробная контаминация ткани селезенки.

На рисунке представлен удельный вес различных микроорганизмов, выявленных в образцах легочной ткани.

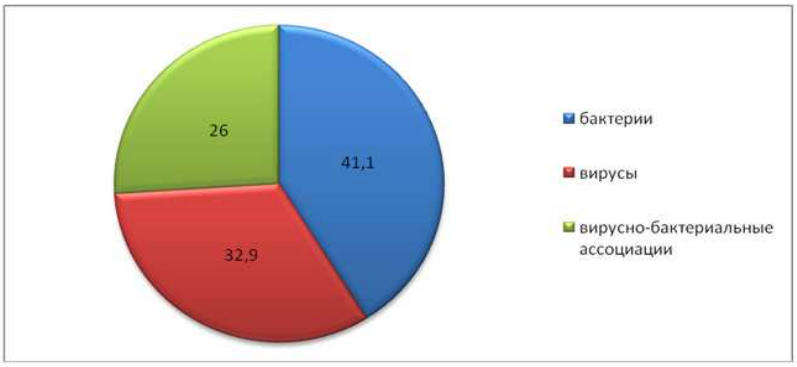



Рисунок — Контаминация легочной ткани микроорганизмами (%)

Как свидетельствуют приведенные данные, в 43 образцах (58,9%) были обнаружены вирусные антигены, при этом в 19 случаях (26,0%) — в составе вирусно-бактериальных ассоциаций, в 30 случаях (41,1%) из легочной ткани были выделены бактерии.

В таблице представлена структура респираторных вирусов, антигены которых были обнаружены в легочной ткани умерших детей при отрицательных результатах бактериологического обследования.

Таблица — Структура респираторных вирусов, выявленных при исследовании легочной ткани

| Вирусы | Частота встречаемости | |
|---|---|---|
| | абс. цифры | % |
| РС | 20 | 58,9 |
| Аденовирусы | 5 | 14,7 |
| Парагрипп | 4 | 11,8 |
| Грипп В | 3 | 8,8 |
| Грипп А1 | 1 | 2,9 |
| Грипп А3 | 1 | 2,9 |
| Всего | 34 | 100 |

В большинстве случаев (58,9%) это были респираторно-синцитиальные вирусы. Наряду с ними также выявляли антигены аденовирусов, вирусов гриппа и парагриппа, но в гораздо меньшем проценте случаев (таблица). Интересно отметить, что ни в одном случае не были обнаружены пред-

ставители семейства *Herpes viridae*. Возможно, это объясняется особенностью использования методических приемов для обнаружения вирусов.

Как уже указывалось, в 19 образцах легочной ткани (26,0%) констатировали наличие вирусно-бактериального инфицирования. В качестве ассоциантов в этих случаях чаще выступали респираторно-синцитиальные вирусы. Их антигены выявляли, как правило, с бактериями — представителями рода *Enterococcus*.

Из 5 наблюдений в одном образце исследуемого материала регистрировали антигены различных видов вирусов, чаще это было сочетание респираторно-синцитиальных вирусов с вирусами гриппа.

Следует подчеркнуть, что в соответствии с результатами анализа клинических данных и протоколов патологоанатомического вскрытия внутриутробные пневмонии, обусловленные вирусно-бактериальными ассоциациями, отличались наиболее тяжелым течением и, как следствие, летальностью в раннем неонатальном периоде. Продолжительность жизни таких детей, как правило, не превышала 3 сут (12 случаев из 19).

**Выводы:**

1. В результате комплексного вирусно-бактериального исследования 94 образцов ткани легких детей с внутриутробными летальными пневмониями в 73 случаях (77,7%) выявлены различные микроорганизмы.

2. В 58,9% случаев в образцах ткани легкого были обнаружены антигены различных респираторных вирусов. При этом в 26% случаев они были выявлены в сочетании с бактериями. Респираторно-синцитиальные преобладали среди различных видов вирусов.

3. На основании клинико-морфологического анализа можно констатировать, что вирусно-бактериальные пневмонии отличались тяжелым и крайне тяжелым течением и чаще приводили к летальному исходу в раннем неонатальном периоде.

**Литература**

1. Горбунов, Е.Ф. Внутриутробные инфекции, их значение в перинатальной патологии, возможности диагностики и профилактики / Е.Ф. Горбунов // Вестн. НовГУ им. Я. Мудрого. — 2006. — № 35. — С. 42–44.

2. Гулиев, Н.Д. Внутриутробные инфекции у новорожденных детей / Н.Д. Гулиев, Н.В. Мамедова // Вопр. современ. педиатрии. — 2006. — № 5. — С. 165–166.

3. Косенкова, Е.Г. Инфекции, специфичные для перинатального периода (внутриутробные инфекции): распространенность, этиопатогенез и диагностика / Е.Г. Косенкова, И.М. Лысенко, Л.Н. Журавлева // Охрана материнства и детства. — 2011. — № 2 (18). — С. 18–25.

4. Viral Infections: Contributions to Late Fetal Death, Stillbirth, and Infant Death / E.J. Williams [et al.] // J. Pediatr. — 2013. — March, 16. — P. 147–149.

5. Внутриутробная инфекция в генезе аномалий развития бронхолегочной системы при фетоинфантильных потерях / О.В. Островская [и др.] // Дальневост. мед. журн. — 2005. — № 4. — С. 5–9.

6. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ Минздрава СССР от 22 апреля 1985 г. № 535. — Режим доступа: http://zakon.law7.ru/legal2/se4/pravo4231/index.htm.

## APPLICATION OF THE DIRECT IMMUNOFLUORESCENCE FOR DIAGNOSTICS OF INTRAUTERINE PNEUMONIA BY VIRAL ETIOLOGY

**Sokolova E.A., Gorovitc E.S., Freund G.G.**

*Perm State Academy of Medicine named after Academicion E.A. Wagner, Perm, Russia*

Questions of diagnostics of intrauterine pneumonia of viral etiology are discussed. Complex viral and bacterial investigation of 94 lung tissue samples from children with lethal intrauterine pneumonia showed, that in 73 cases (77.7%) there were infection. In 58.9% of the samples of lung tissue by direct immunofluorescence reaction antigens of various respiratory viruses were detected by direct immunofluorescence. At that, in 26% of cases they have been identified in conjunction with bacteria. Respiratory syncytial viruses dominated among the various types of respiratory viruses. Clinical and morphological analysis showed that viral-bacterial pneumonia differs the most severe course and often leads to death in the early neonatal period.

**Keywords:** intrauterine pneumonia, viral etiology.

Поступила 02.09.2013

# ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ УЧАСТКИ ГЕНОМОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА: ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗА И АНАПЛАЗМОЗА

**Счесленок Е.П., Семижон П.А., Князева О.Р., Девятникова В.А., Мишаева Н.П., Красько А.Г., Владыко А.С.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Сконструированы на основе вектора pJET1.2/blunt рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки нуклеотидных последовательностей, соответствующих генам 23S rRNA B. burgdorferi sl. размером 75 п.о., msp2 A. phagocytophilum размером 77 п.о. Гибридные плазмиды использованы в качестве положительных контрольных образцов, позволяющих оценивать специфичность прохождения стадии ПЦР для выявления генетического материала данных возбудителей клещевых инфекций (КИ).

**Ключевые слова:** возбудители КИ, плазмидный вектор, рекомбинантные плазмидные ДНК, ПЦР в режиме реального времени, положительные контрольные образцы.

**Введение.** Клещи — это группа широко распространённых во всём мире облигатных акарид-гематофагов, паразитирующих на всех классах позвоночных, включая человека и, являясь переносчиками и источником инфицирования опасными вирусными и бактериальными инфекциями, представляют собой серьезную проблему для практического здравоохранения. В настоящее время в Республике Беларусь отмечается изменение климатических условий (в сторону потепления), что привело к значительному увеличению естественного роста численности природных хозяев — мышевидных грызунов и, соответственно, популяций клещей. Немаловажную роль в увеличении уровня заболеваемости клещевыми инфекциями играет высокая занятость населения в сельскохозяйственных работах, так как возрастает вероятность контакта человека с источниками инфицирования.

В последние десятилетия внимание медицинской общественности привлечено к проблеме микст-инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Показано, что один и тот же клещ может быть переносчиком до 7 патогенных для человека агентов вирусно-бактериальной природы, причем множественость заражения клещей является правилом, а не исключением. При присасывания мультизараженного клеща у человека может развиться как моноинфекция, так и несколько клещевых инфекций в различных сочетаниях и разнообразных клинических формах Известно, что в структуре клещевых инфекций до 36% занимают микст-инфекции [1, 2].

Методы молекулярной диагностики, основанные на полимеразной цепной реакции, являются чувствительным, специфичным и быстрым инструментом как для детекции, так и для идентификации возбудителей клещевых инфекций в крови, биопсийных образцах кожи и даже в клещах. В настоящее время метод ПЦР-диагностики широко используется для детекции *B. burgdorferi* и A. phagocytophilum как в клинических образцах, так и в популяции клещей (полевые образцы) [3, 4]. Наиболее эффективным методом является мультиплексная полимеразная цепная реакция, позволяющая одновременно проводить детекцию нескольких патогенов КИ в исследуемых образцах.

**Целью** данного исследования явилось получение рекомбинантных плазмидных ДНК, содержащих в качестве вставки фрагменты генов *B. burgdorferi sl.*, *A. phagocytophilum*, и использование их в качестве положительных контролей при проведении ПЦР.

**Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *Borrelia burdorferi sensu stricto* (Mn 591) и *B. garinii* (Mn 590), полученные из специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ и клещи *I. ricinus*, собранные с растительности в природных очагах на территории республики.

***Выделение бактериальной ДНК.*** Для выделения ДНК возбудителей клещевых инфекций человека из полевого и клинического материала использовали набор «РИБО-преп» фирмы «АмпліСенс» (Россия). Все манипуляции проводились в соответствии с инструкцией производителя.

Олигонуклеотидные последовательности для амплификации фрагментов генов возбудителей КИ:

| Праймер | Нуклеотидная последовательность | Позиция нуклеотидов | Фрагмент гена (п.о.) |
|---|---|---|---|
| Bb23Sf | 5'-CGAGTCTTAAAAGGGCGATTTAGT-3' | 713-736 | 23S rRNA |
| Bb23Sr | 5'-GCTTCAGCCTGGCCATAAATAG-3' | 787-766 | 75 |
| ApMSP2f | 5'-ATGGAAGGTAGTGTTGGTTATGGTATT-3' | 168-195 | msp2 |
| ApMSP2r | 5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3' | 245-226 | 77 |

***Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР).*** В плашки для амплификации (BioRad) вносили по 25 пмолей соответствующих праймеров, 5 мкл 10X TrueStart™ Taq Buffer (Fermentas, Литва), 4 мкл 25 mM $MgCl_2$, 1 мкл дНТФ (10 мМ каждого), по 5 мкл ДНК-матрицы, 0,5 µl TrueStart™ Taq DNA Polymerase (5 u/µl, Fermentas, Литва) деионизованной воды до конечного объема 50 мкл. Закрывали плашку оптически-прозрачной пленкой и и переносили в амплификатор (BioRad iQ5). Режим амплификации: 95°C — 10 мин; 95°C — 15 с; 60°C — 30 с, 72°C — 45 с, количество циклов — 45.

***Анализ фрагментов ДНК,*** синтезированных в ПЦР, проводили электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 в/см в трис-ацетатном буфере, pH 8,0, в течение 25–35 мин. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ.

***Конструирование рекомбинантных плазмид.*** Для создания гибридных векторов использовали коммерческий набор реагентов PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, K1232). Предварительно проводили очистку встраиваемого ДНК-фрагмента с использованием набора реагентов QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. № 28704), Qiagen, согласно прилагаемой инструкции. Клонирование осуществляли по «тупым» концам в исходный вектор pJET1.2/blunt, процесс включал 2 основные стадии:

- подготовка фрагмента, так называемое «затупливание» концов. Состав реакционной смеси: 10 мкл 2xReaction buffer, ДНК-фрагмент в количестве от 5 до 15 нг, 1 мкл DNA Blunting Enzyme, деионизованную воду до 18 мкл. Смесь инкубировали 5 мин при температуре +70ºC, далее кратковременно охлаждали на льду;

- лигирование фрагмента в вектор. В полученную на предыдущей стадии смесь вносили 1 мкл pJET1.2/blunt Cloning Vector, 1 мкл фермента T4 DNA Ligase. инкубировали 5 мин при +22°C . Полученную лигазную смесь использовали далее для трансформации компетентных клеток.

***Приготовление компетентных клеток E.coli.*** Отдельные колонии клеток *E.coli* (штамм DH5α) вносили бактериологической петлей в 5 мл LB-бульона, помещали на шейкер в термостат и инкубировали в течение 2–3 ч до достижения культурой логарифмической фазы роста. Полученную культуру охлаждали до 4°C и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл охлажденного 0,1 М раствора $CaCl_2$, оставляли на 2 ч при 4°C. Бактерии осаждали 10 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспензировали в 0,1 мл охлажденного раствора $CaCl_2$.

Трансформация компетентной культуры плазмидной ДНК. В 100 мкл компетентной бактериальной культуры вносили по 20 мкл лигазной смеси, выдерживали 30 мин при +4°C, делали тепловой шок при 42°C в течение 2 мин, затем помещали в ледяную баню (+4°C) на 2 мин, после чего добавляли 900 мкл бульона и инкубировали 1 ч при 37°C. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в 100 мкл среды. Трансформанты высевали на селективную среду, содержащую ампициллин (50 мкг/мл). В результате селекции отбирали и накапливали в питательной среде по 5–6 одиночных колоний для каждой трансформированной плазмиды.

***Выделение плазмидной ДНК.*** Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, k#27104).

***Рестрикционный анализ гибридных плазмид.*** Обработку плазмидных ДНК проводили при 37°C в течение 2 ч рестриктирующей эндонуклеазой Bgl II в конечном объеме 20 мкл. Реакционная смесь содержала по 10–100 мкг соответствующих плазмидных ДНК, однократный буфер для фермента рестрикции и по 1 U фермента рестрикции. После инкубации ферменты инактивировали в течение 15 мин при 65°C.

**Результаты и их обсуждение.** С использованием специфических праймеров на матрице ДНК *B. burgdorferi* и *A. phagocytophilum* в ПЦР были получены фрагменты ДНК участков генов 23S rRNA размером 75 п.о. и msp2 размером 77 п.о. Фрагменты ДНК, представляющие собой диагностически значимые участки геномов *Borrelia burdorferi sensu lato* и *A. phagocytophillum* были клонированы по «тупым» концам в полилинкер плазмидного вектора pJET1.2/blunt (рисунок 1).

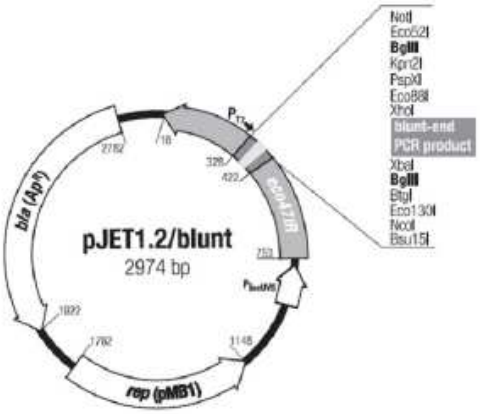
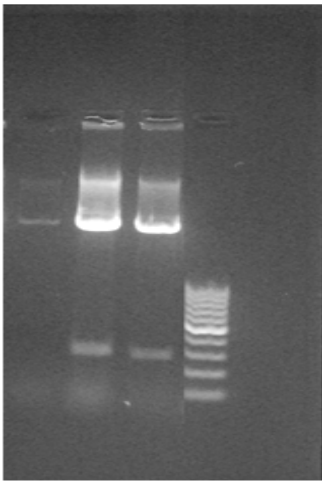



Рисунок 1 — Карта плазмиды pJET1.2/blunt

Особенностью данного вектора является наличие гена «летальности», который повреждается при встраивании в плазмидную ДНК чужеродного фрагмента, что обеспечивает 100% эффективность клонирования гибридных плазмидных ДНК в компетентные клетки *E.coli*. В результате были получены оригинальные гибридные векторы, содержащие специфические фрагменты генетического материала возбудителей КИ человека. Полученными плазмидными ДНК были трансформированы компетентные клетки *E.coli*, штамм Dh5α. Клетки выращивали на твердой селективной питательной среде, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. После инкубации в течение ночи при 37ºС отдельные колонии клеток рассевали штрихом и выращивали при тех же условиях. Дальнейшее выделение из бактериальных клеток *E.coli*, штамм Dh5α рекомбинантных плазмидных ДНК и их обработка рестриктирующей эндонуклеазой Bgl II позволили подтвердить наличие специфических фрагментов в составе гибридных плазмид (рисунок 2).



1 2 3 4

Дорожки: 1 — ДНК вектора pJET1.2/blunt, обработанная эндонуклеазой Bgl II;
2, 3 — гибридные плазмидные ДНК, содержащие вставки участков геномов *B. burdorferi sl.* (75 п.о.), *A. phagocytophillum* (77 п.о.), соответственно обработанные эндонуклеазой Bgl II;
4 — DNA ladder 50 bp.

Рисунок 2 — Электрофоретический анализ фрагментов ДНК, образующихся в результате рестрикции гибридных векторных ДНК

Размеры образовавшихся ДНК-фрагментов включают непосредственно соответствующую специфическую последовательность и последовательность плазмидной ДНК (46 н.п.). В результате были сконструированы рекомбинантные плазмиды: pJET1.2/blunt/B.b. sl. и pJET1.2/blunt/A.ph., содержащие диагностически значимые участки геномов данных возбудителей КИ.

Для оценки специфичности полученных рекомбинантных плазмид и возмож ности использования их в качестве положительных контрольных образцов в мультиплексной тест-системе для оценки стадии прохождения ПЦР, была проведена работа по подбору оптимальных концентраций гибридных плазмидных ДНК.

Полученные гибридные ДНК были разведены десятикратно от $10^{-1}$ до $10^{-7}$ и препараты ДНК в разведении от $10^{-3}$ до $10^{-7}$ были использованы в качестве матрицы для постановки ПЦР в режиме реального времени со специфическими праймерами и гибридизационными пробами, меченными флюорофорами: Bb23Sp-FAM 5'-AGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGTG-3'и ApMSP2p ROX 5'-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3' Результат постановки ПЦР в режиме реального времени на матрице рекомбинантной плазмидной ДНК pJET1.2/blunt/B.b. sl представлен на рисунке 3. Анализ кривых флюоресценции показал наличие продукта специфической амплификации во всех пробах, о чем свидетельствует флюоресценция, регистрируемая по каналу FAM начиная с 14, 16, 22, 25 и 30 циклов для образцов ДНК в разведении от $10^{-3}$ до $10^{-7}$ соответственно.

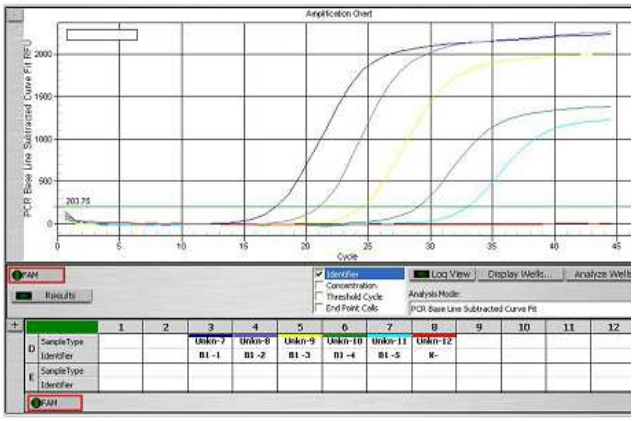



Рисунок 3 — Результат амплификации на матрице рекомбинантной ДНК pJET1.2/blunt/B.b. sl.

Для сравнительной оценки специфического включения флюоресцентной метки при постановке ПЦР на матрицах рекомбинантных плазмидных ДНК (ПКО) в разведении $10^{-4}$, ДНК культуральных штаммов и ДНК, выделенных из полевого материала, были подготовлены следующие пробы: ДНК, выделенная из культурального штамма *B. burdorferi sensu stricto* (Mn 591), ДНК, выделенная из культурального штамма *B. garini*i (Mn 590), одна проба ДНК *B.burgdorferi*, 2 пробы ДНК *A. phagocytophilum*, выделенные из полевого материала (клещей *I. ricinus*). Подбор проб, содержащих генетический материал возбудителей КИ, проводили с использованием коммерческого набора реагентов «АмплиСенс TBEV, B. burgdorferi sl, A. phagocytophilum/E. muris-FL» (Россия). Результаты постановки ПЦР с использованием ПЦР-смеси, содержащей праймеры и гибридизационные пробы для амплификации и детекции специфических фрагментов генома возбудителей ЛБ (по каналу FAM) и анаплазмоза (по каналу ROX), представлены на рисунке 4. Из рисунка видно (4А), что во всех пробах, содержащих ДНК *B. burgdorferi* (начало включения флюорофора на 27 и 30 циклах), и в пробе ПКО (pJET1.2/blunt/B.b. sl ), начиная с 18 цикла, регистрируется продукт специфической амплификации по каналу FAM и по каналу ROX (4Б) регистрируется продукт специфической амплификации в 3 пробах: ПКО- pJET1.2/blunt/ A.ph. с 22 цикла и в пробах, содержащих ДНК *A. phagocytophilum*, с 25 и 33 цикла соответственно. Во всех пробах отмечается высокий уровень интенсивности регистрируемого сигнала.

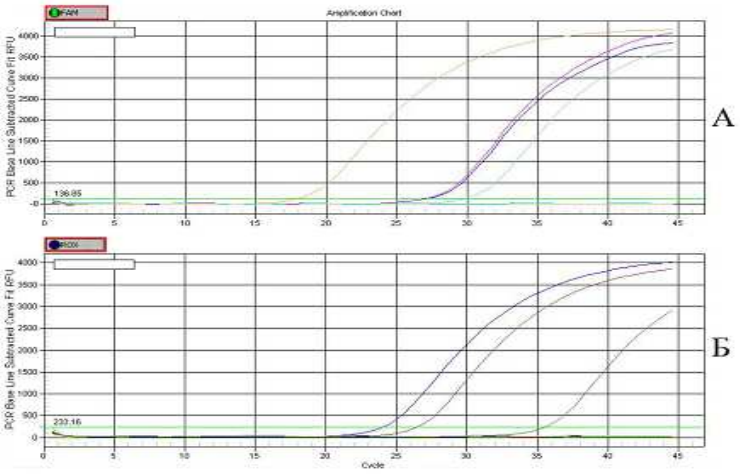



Рисунок 4 — Сравнительный анализ ДНК-матриц возбудителей КИ в мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени

Таким образом, в результате исследований на основе вектора pJET1.2/blunt получены генно-инженерные конструкции, содержащие диагностически значимые участки геномов возбудителей клещевых инфекций человека: Лайм-боррелиоза и анаплазмоза. Показана возможность использования полученных гибридных плазмидных ДНК в качестве положительных контрольных образцов, позволяющих оценивать специфичность прохождения стадии ПЦР для выявления генетического материала *B. burgdorferi sl.* и *A. phagocytophilum*.

**Литература**

1. Функционирование очагов смешанных клещевых инфекций на территории России / А.Н. Алексеев [и др.] // Мед. паразитол. — 1996. — № 4. — С. 9–16.

2. Клинические варианты микст-инфекций (КЭ+ЛБ) / С.О. Вельгин [и др.] // Журн. эпидемиологии и инфекционных болезней. — 2007. — № 3. — С. 38–41.

3. Infection and co-infection rates of Anaplasma phagocytophilum variants, Babesia spp., Borrelia burgdorferi, and the rickettsial endosymbiont in Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) from sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin / F.E. Steiner [et al.] // J. Med. Entomol. — 2008. — Vol. 45, № 2. — P. 289–297.

4. Identification of Anaplasma phagocytophilum in tick populations in Estonia, European Part of Russia and Belarus / O. Katargina [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2011. — Vol. 18, № 1. — P. 40-46.

## THE RECOMBINANT CONSTRUCTS CONTAINING THE DIAGNOSTICALLY SIGNIFICANT GENOM REGIONS OF AGENTS OF HUMAN TICK-BORNE INFECTIONS: LYME BORRELIOSIS AND ANAPLASMOSIS

**Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Kniazeva O.R., Deviatnikova V.A., Mishaeva N.P., Krasko A.G., Vladyko A.S.**

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

The recombinant plasmids with vector pJET1.2/blunt containing inserts of nucleotide sequences corresponding to the 23S rRNA gene of *B. burgdorferi* sl., size 75 bp and msp2 gene of *A. phagocytophilum*, size 77 bp, were designed.

Plasmids were used as positive control samples, allowing to estimate the specificity of the PCR step passing genetic material to identify of these agents of tick-borne infections.

Поступила 06.09.2013

# ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ СО МНОЖЕСТВЕННОЙ И ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

**Титов Л.П.[1], Гончаров А.Е.[1], Скрягина Е.М.[2], Шпаковская Н.С.[2], Скрягин А.Е.[2], Романова И.В.[1], Солодовникова В.В.[2]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Проведена оценка показателей иммунного статуса у 6 пациентов с туберкулезом со множественной и широкой лекарственной устойчивостью до и после курса иммунотерапии дендритными клетками, праймированными короткоцепочечным пептидом протеина CFP-10. В результате исследования установлено отсутствие значимых изменений в основных иммунофенотипических показателях. В то же время выявлено увеличение пула антигенспецифических Т-клеток периферической крови через 1–2 мес. после окончания терапии дендритными клетками у всех пациентов, принявших участие в исследовании.

**Ключевые слова:** туберкулез, дендритные клетки, иммунитет, Т-регуляторные клетки.

**Введение.** Туберкулез (ТБ) — хроническая бактериальная инфекция, вызываемая *M. tuberculosis*. ТБ представляется важнейшей проблемой фундаментальной и практической медицины. В мире ТБ занимает лидирующую позицию среди хронической инфекционной патологии [1]. Республика Беларусь относится к странам с высоким уровнем заболеваемости ТБ, распространенностью мультирезистентных (МЛУ) форм ТБ [1, 2].

Проведенные авторами в 2009–2010 гг. клинические испытания метода иммунотерапии МЛУ ТБ с использованием дендритных клеток (ДК), праймированными антигенами микобактерий, показали эффективность использования ДК для лечения пациентов данной группы. Так, установлено, что сочетание стандартной схемы химиотерапии МЛУ ТБ с применением ДК способствовало снижению массивности бактериовыделения, положительной рентгенологической динамике [3]. В 2011 г. в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии были проведены дальнейшие исследования, которые позволили оптимизировать методику получения функционально активных ДК из стволовых клеток костного мозга пациентов с ТБ: подобрать оптимальную питательную среду, комбинацию цитокинов и специфические для микобактерий белки, необходимые для праймирования ДК [4]. В настоящее время на базе РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии проводят клинические испытания метода иммунотерапии ТБ с использованием ДК, генерированных из ГСК костного мозга.

**Цель:** изучение изменения содержания основных субпопуляций лимфоцитов и антигенспецифических Т-клеток у пациентов в процессе иммунотерапии ДК.

**Материалы и методы.** Объекты исследований. Для выполнения *ex vivo* исследований были использованы 12 образцов периферической крови пациентов с МЛУ ТБ, предоставленных РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии.

***Определение иммунофенотипа клеток.*** Иммунофенотип лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием 3–4 цветовых меток. Кровь в количестве 50 мкл инкубировали с моноклональными антителами 15 мин при 4°С. Затем лизировали эритроциты в растворе хлорида аммония и учитывали образцы на проточном цитофлуориметре. Для корректной настройки параметров компенсации для каждой группы образцов готовили single-stained контроли. В каждом образце подсчитывали минимум 5×104 клеток.

***Определение АСК. Активация.*** К крови в количестве 500 мкл добавляли синтетический пептид CFP-10 (50 мкг/мл) и 100 мкл DPBS, доводили объем средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали суспензию 18 ч при 37°С. Затем добавляли монензин (10 мкг/мл) и дополнительно культивировали клетки на протяжении 2 ч. Кровь, культивированную по вышеописанной методике, в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами к CD4 на протяжении 15 мин при температуре 4°С. Лизировали эритроциты раствором хлорида аммония на протяжении 10–15 мин при температуре 18–25ºС. Затем осаждали клетки центрифугированием 5 минут при 250 g, удаляли супернатант. Клетки в количестве $1{,}0–2{,}0\times10^5$ фиксировали 10 минут в 500 мкл 4% раствора параформальдегида, затем объем клеточной взвеси клеток доводили фосфатным буфером до 3 мл и центри-

фугировали 5 мин при 200 g для осаждения клеток. Удаляли супернатант и ресуспендировали клетки в 500 мкл 0,1% раствора сапонина на DPBS для пермеабилизации. Инкубировали 10 мин, после чего отмывали в 3 мл 0,03% раствора сапонина на DPBS. Надосадочную жидкость удаляли, клетки инкубировали с моноклональными антителами к интерферону-γ 15 мин при 4°C. После истечения времени инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител, суспендировали в 200–300–500 мкл 0,03% раствора сапонина на DPBS и проводили учет результатов на проточном цитофлюориметре.

***Статистический анализ.*** Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения «Statistica» версии 10 («StatSoft», США). Значения показателей представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха между 25 и 75-й процентилями. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения двух зависимых выборок использовали непараметрический критерий Уилкоксона. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p<0,05$ [5].

**Результаты и их обсуждение.** В настоящее время обследовано 6 пациентов с ТБ до проведения иммунотерапии ДК и спустя 1–2 мес. после завершения всех этапов программы клинических испытаний. Определяли содержание Т-клеток и их субпопуляций (Т-хелперы, Т-цитотоксические клетки, Т-регуляторные клетки, CD28+ Т-клетки), В-клеток и их субпопуляций (CD19+ В-клетки, В1-клетки, В-клетки памяти), естественных киллеров (ЕК-клетки) и антигенспецифических Т-клеток, специфичных к протеину CFP-10 (АСК).

Результаты исследований представлены в таблице 1 (относительные значения — процентное отношение субпопуляций среди лимфоцитов). Также приведены данные об абсолютном содержании субпопуляций лимфоцитов в процессе проведения иммунотерапии ДК (таблица 2).

Таблица 1 — Субпопуляции лимфоцитов пациентов до и после терапии дендритными клетками (относительные величины)

| Субпопуляция клеток | До терапии | После терапии | p |
|---|---|---|---|
| АСК, % (от числа Т-хелперов) | 0,13 (0,00–0,34) | 0,66 (0,43–1,10) | 0,03 |
| $CD3^+$ Т-лимфоциты, % | 65,7 (57,2–76,5) | 65,5 (60,3–74,8) | 0,9 |
| $CD4^+$ Т-хелперы, % | 41,5 (38,4–51,2) | 38,0 (35,4–52,6) | 0,2 |
| $CD8^+$ Т-цитотоксические клетки, % | 21,6 (17,5–25,6) | 20,2 (17,6–21,4) | 0,8 |
| $CD3^+CD16^-CD56^-$ ЕК-клетки, % | 19,4 (11,2–30,1) | 18,0 (12,3–25,6) | 0,2 |
| $CD4^+CD25^{high}$ Т-рег. клетки, % | 3,0 (2,8–5,2) | 4,1 (3,1–5,5) | 0,46 |
| CD28 лимфоциты, % | 54,7 (47,1–61,9) | 51,5 (46,1–59,6) | 0,25 |
| $CD19^+$ В-лимфоциты, % | 8,4 (7,0–10,7) | 10,9 (9,1–18,6) | 0,60 |
| CD19CD5 В1-клетки, % | 2,5 (1,6–5,0) | 3,6 (2,4–5,6) | 0,46 |
| $CD19^+CD5^-CD27^+$ В-клетки памяти, % | 1,2 (0,6–2,2) | 2,1 (1,4–2,5) | 0,35 |

Таблица 2 — Субпопуляции лимфоцитов пациентов до и после терапии дендритными клетками (абсолютные показатели)

| Субпопуляция клеток | До терапии | После терапии | p |
|---|---|---|---|
| $CD3^+$ Т-лимфоциты, $\times10^9$/л | 1,52(1,23–1,84) | 1,20(1,18–1,97) | 0,60 |
| $CD4^+$ Т-хелперы, $\times10^9$/л | 1,00(0,82–1,26) | 0,84(0,59–1,04) | 0,35 |
| $CD8^+$ Т-цитотоксические клетки, $\times10^9$/л | 0,50(0,36–0,60) | 0,41(0,31–0,57) | 0,46 |
| $CD3^+CD16^-CD56^-$ ЕК-клетки, $\times10^9$/л | 0,35(0,24–0,97) | 0,29(0,24–0,58) | 0,17 |
| $CD4^+CD25^{high}$ Т-рег. клетки, $\times10^9$/л | 0,07(0,05–0,13) | 0,08(0,05–0,11) | 0,75 |
| $CD28^+$ лимфоциты, $\times10^9$/л | 1,17(0,90–1,64) | 1,02(0,77–1,57) | 0,25 |
| $CD19^+$ В-лимфоциты, $\times10^9$/л | 0,21(0,17–0,25) | 0,30(0,18–0,31) | 0,35 |
| $CD19^+CD5^+$ В1-клетки, $\times10^9$/л | 0,07(0,04–0,11) | 0,07(0,04–0,14) | 0,35 |
| $CD19^+CD5^-CD27^+$ В-клетки памяти, $\times10^9$/л | 0,04(0,01–0,04) | 0,03(0,02–0,05) | 0,35 |

Как видно из представленных материалов, у пациентов с ТБ не наблюдается статистически достоверных изменений показателей иммунного статуса в ответ на терапию ДК.

Исследование содержания Т-регуляторных клеток и АСК, проведенное в предыдущем исследовании [3], показало, что в процессе иммунотерапии ДК существенно увеличивается содержание этих двух субпопуляций Т-клеток.

Несмотря на то, что практически у всех пациентов с ТБ выявляют АСК (в том числе с целью диагностики), пул клеток, специфичных по отношению к протеину CFP-10 был до начала терапии ДК невелик. Так, у двух из 6 пациентов АСК вообще отсутствовали. В процессе иммунотерапии ДК у всех пациентов, принявших участие в испытании зарегистрировано увеличение числа АСК. Таким образом, предварительные результаты проводимых в настоящее время клинических испытаний указывают на увеличение пула АСК, что является важным критерием, указывающим на эффективность применения праймированных антигенами микобактерий ДК и стимуляцию иммунитета в отношении антигенов микобактерий со множественной и широкой лекарственной устойчивостью

В то же время, результаты исследования показывают, что направленность изменения числа Т-регуляторных клеток у пациентов происходила по-разному, что может указывать на индивидуальные особенности иммунной реактивности (рисунок).

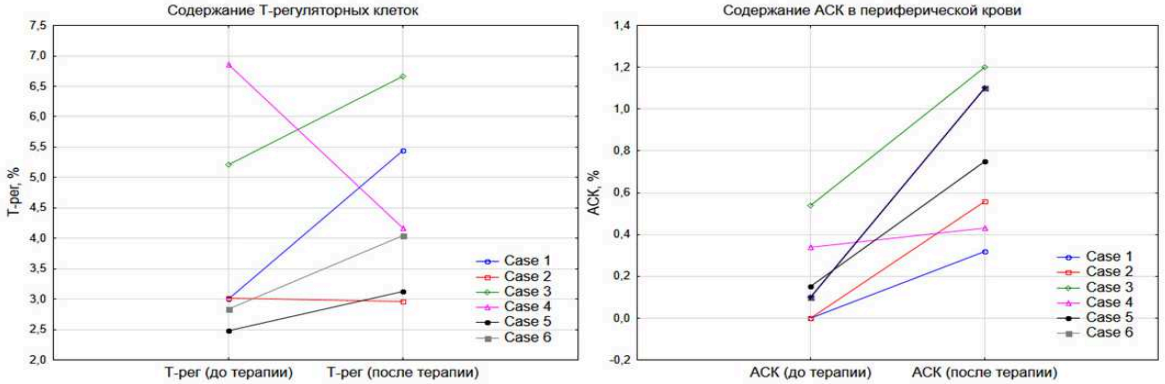



Рисунок — Содержание АСК и Т-регуляторных клеток у пациентов с туберкулезом до и после клеточной иммунотерапии

**Выводы.** Нами проведена оценка основных показателей иммунного статуса у 6 пациентов с туберкулезом со множественной и широкой лекарственной устойчивостью до и после проведения курса иммунотерапии дендритными клетками, праймированными короткоцепочечным пептидом протеина CFP-10.

Установлено отсутствие значимых изменений в основных показателях, иммунного статуса, что согласуется с результатами наших предыдущих исследований. В то же время выявлено значительное увеличение пула антигенспецифических Т-клеток периферической крови через 1–2 мес. после окончания терапии дендритными клетками у всех обследованных пациентов, что прямо указывает на иммунологическую эффективность такой терапии.

**Литература**

1. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update / D. Falzon [et al.[ // Eur. Resp. J. — 2011. — Vol. 38, № 3. — P. 516–528.

2. Проблема множественной лекарственной устойчивости среди больных туберкулезом и ВИЧ-ассоциированным туберкулезом в республике Беларусь / [Е.М. Скрягина и др.] // Проблемы фтизиатрической службы на современном этапе: материалы VII съезда фтизиатров Респ. Беларусь и науч.-практ. конф. «Диагностика и лечение туберкулеза в свете международной стратегии DOTS», Минск, 22–23 мая 2008 г. — Минск, 2008. — С.69–90.

3. Иммунофизиологическая и клиническая эффективность иммунотерапии пациентов с мультирезистентным туберкулезом легких нановакциной на основе аутологичных моноцитарных дендритных клеток / Л.П. Титов [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 1. — С. 53–60.

4. Оптимизация метода получения дендритных клеток из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга для иммунотерапии пациентов с туберкулезом / А. Е. Гончаров [и др.] // Доклады НАН Беларуси. — 2012. — Т. 56, № 4. — С. 94–102.

5. A guide to modern statistical analysis of immunological data / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. ——2007. — Vol. 8, № 27. — P. 27.

## IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF AUTOLOGOUS DENDRITIC CELLS APPLICATION IN THE THERAPY OF PATIENTS WITH MULTIPLE-DRUG RESISTANT AND EXTREME-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS

**Titov L.P.[1], Hancharou A.Y.[1], Skrahina E.M.[2], Shpakovskaya N.S.[2], Skrahin A.Y.[2], Ramanava I.U.[1], Solodovnikova V.V.[2]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Republican Scientific & Practical Center for Pulmonology & Phthysiology, Minsk, Belarus*

The estimation of the immune status in 6 patients with multiple-drug resistant and extreme-drug resistant pulmonary tuberculosis was carried out before and after treatment with dendritic cells primed with CFP-10 protein.

No statistically significant changes in the immune status parameters including T- and B-cell subpopulations were found. However the increase of antigen specific T-cells 1–2 months after the treatment was determined in all patients participating in the trials, indicative of the development of immune response to mycobacterial antigens.

**Keywords:** tuberculosis, dendritic cells, immunity, T-regulatory cells.

Поступила 02.09.2013

## ФИКСАЦИЯ БИОПТАТОВ ПЕЧЕНИ

**Андреев В.П., Цыркунов В.М., Матиевская Н.В.**

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь*

**Резюме.** Представлен способ фиксации прижизненных биоптатов печени путем последовательного использования нескольких фиксирующих смесей, позволяющий достичь стабилизации структуры тканей в большом объеме биоптата, устранить автолиз в глубине образца и дать возможность для визуальной дифференцировки популяций клеток печени в световом микроскопе.

**Ключевые слова:** фиксация тканей, биопсия печени, патоморфологическое исследование, световая микроскопия.

**Введение.** Методические приемы клинической морфологии сегодня необходимы не только для диагностики и прогнозирования исхода заболевания, но и для решения многих научно-исследовательских задач. Для клинициста представляет интерес достоверная информация о цитоархитектонике печени в целом и всех популяций клеток органа, как эпителиальных (собственно гепатоцитов и холангиоцитов), так и синусоидальных (эндотелиальных, Купферовских, звездчатых), а также лимфоцитов, ассоциированных с печенью. Первые три типа клеток в условиях вирусной инфекции (или другой патологии) могут становиться антигенпрезентирующими и участвовать в иммунопатологических реакциях. Поскольку печень является важным органом иммунной системы, постоянно подвергающимся воздействию многочисленных антигенов (вирусной и другой, невирусной природы), важным является оценка количественного и качественного клеточного состава (агрессивные лимфоциты, плазматические клетки, моноциты, макрофаги, ПИТ-клетки и др.) в локальных очагах иммунного ответа.

В связи с этим, детальное изучение прижизненных биоптатов печени на уровне световой микроскопии с идентификацией типов синусоидальных (клетки Купффера, агрессивные лимфоциты, эндотелиальные клетки, ПИТ-клетки, дендритные клетки, звездчатые ретикулоэндотелиоциты — клетки Ито и др.) и паренхиматозных клеток печени, с возможностью выявления и оценки состояния внутриклеточных органелл и структур необходимо для изучения патогенеза поражения печени различной этиологии, разработки и внедрения в клиническую практику наиболее рациональный морфологический мониторинг пациентов с патологией печени.

В настоящее время не существует универсальной методики для фиксации биоптатов печени, позволяющей сохранять тонкую структуру клеток, приближающуюся к прижизненному состоянию.

Это связано с тем, что ткань печени является трудным объектом для морфологического изучения, поскольку ее клетки содержат большое количество белков, коагуляция которых препятствует проникновению фиксаторов и тем самым стабилизации ее структуры.

**Цель** исследования: разработать новый комплексный способ фиксации биоптатов печени, позволяющий идентифицировать типы синусоидальных и паренхиматозных клеток, а также внутриклеточные структуры на уровне световой микроскопии.

**Результаты и их обсуждение.** Для решения поставленной задачи необходимо было создать условия для того, чтобы различные фиксирующие смеси быстро проникали в значительный по объему биоптат печени, предотвращали автолиз и связанную с ним деструкцию ткани в глубине образца, а также устраняли сжатие, хорошо сохраняли структуру клеток и межуточного вещества и создавали условия для получения оптимально окрашивающихся полутонких (толщиной 0,5–1,0 мкм) срезов из метакрилатных блоков.

Поставленная задача решалась путем фиксации биоптата печени в фиксаторе по Sato Taizan с последующим заключением в метакрилат. При этом отличительным моментом являлось то, что после фиксации биоптата печени в фиксаторе по Sato Taizan его последовательно помещали сначала в фиксирующую смесь, состоящую из фиксатора по Sato Taizan с добавлением 0,4% параформальдегида в соотношении 0,5 мл параформальдегида на 75 мл фиксатора на 2–3 сут, затем на 1 сут в фиксирующую смесь, состоящую из фиксатора Sato Taizan с добавлением 2,4,6-тринитрофенола в количестве 1 мг на 1 мл фиксатора, затем в течение 12 ч производили отмывание биоптата в фиксаторе по Sato Taizan с добавлением 0,5 мл 0,4% параформальдегида на 75 мл фиксатора, затем в течение 30–60 мин биоптат отмывали в 0,1 М фосфатном буфере Зеренсена, затем фиксировали в течение 4–6 ч в 2,5% глютаровом альдегиде, после чего в течение 40 мин биоптат отмывали в 0,1 М фосфатном буфере Зеренсена, и далее биоптат фиксировали в 1% растворе четырехокиси осмия с добавлением дихромата калия в 0,2% концентрации в течение 3–4 ч, после этого биоптат отмывали в 0,1 М фосфатном буфере в течение 40–50 мин, затем обезвоживали последовательно в 40, 50, 60% этиловом спирте, фиксировали в течение 12 ч в 0,2% растворе дихромата калия в 70% этиловом спирте, и обезвоживали последовательно в 80, 90, 96% этиловом спирте, ацетоне. После чего биоптат заливали в метакрилат.

Использование дихромата калий обеспечивало хорошую сохранность и контрастную окраску клеток и внеклеточного матрикса, так как он хорошо реагирует с липопротеидами мембран и делает их нерастворимыми в воде. Кроме этого, дихромат калия способствует выявлению митохондрий в гепатоцитах, сохранению объема ткани при обезвоживании и полимеризации заливочного материала при высокой температуре, а также позволяет получить хороший цветовой контраст при окраске полутонких срезов азур II-основным фуксином.

Приводим иллюстрации конкретного выполнения способа, позволяющего продемонстрировать его возможности при проведении патогистологических исследований образцов печени в световом микроскопе.

На рисунке 1 показан макрофаг (обозначен большой стрелкой) в просвете синусоида, клетка Ито (маленькая стрелка). На рисунке 2 представлены многочисленные цитотоксические лимфоциты (обозначены стрелками), разрушающие гепатоциты. На рисунке 3 показаны гепатоциты (обозначены стрелками) с гипертрофией митохондриального аппарата, окруженные волокнами соединительной ткани (окрашены в красный цвет). На рисунке 4 виден тесный контакт макрофага (обозначен большой стрелкой) с липоцитом (обозначен маленькой стрелкой).

В клинической практике фиксация биоптатов печени для исследования в световом микроскопе наиболее часто проводится в 10% формалине с последующим заключением в парафин и окраской полученных срезов гематоксилин-эозином [1]. Однако данный классический гистологический способ изучения в световом микроскопе парафиновых срезов ткани после формалиновой фиксации не позволяет получить принципиально новую информацию о составе клеточной популяции, поскольку разрешающая способность метода сильно ограничена. Существенным недостатком данного способа является отсутствие возможности детально верифицировать типы синусоидальных и паренхиматозных клеток, из-за чего требуется дополнительное проведение трудоемких и дорогостоящих иммуногистохимических исследований. Кроме того, данный способ не позволяет выявлять внутриклеточные структуры вакуоли, гранулы, митохондрии. Данная фиксация требует дополнительного

использования различных методик обработки и окраски препаратов печени (реакция Перлса, окраска по Ван-Гизону резорцин-фуксином Вейгерта, ШИК-реакция и т. д.), что значительно усложняет и удорожает исследования, требует известного технического навыка.

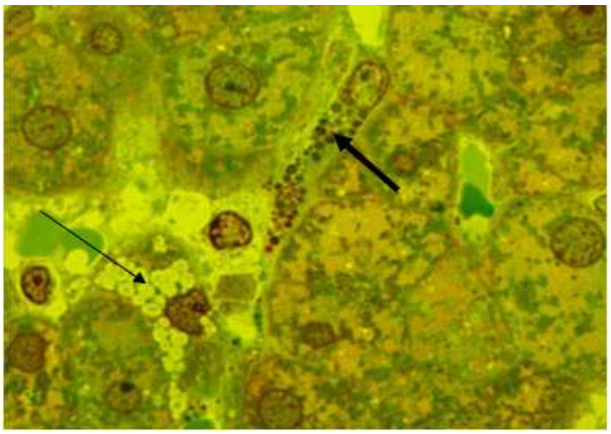


Рисунок 1 — Прижизненный биоптат печени (ко-инфекция ВИЧ/ВГС): макрофаг (обозначен большой стрелкой) в просвете синусоида, клетка Ито (маленькая стрелка). Увеличение: Объектив 100; окуляр. 10. Окраска: азур II, основной фуксин

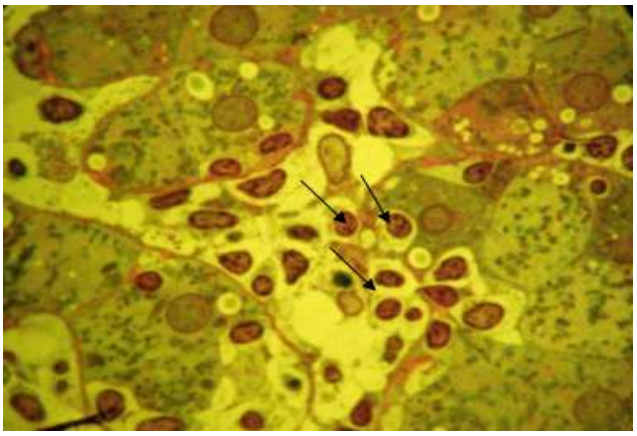


Рисунок 2 — Прижизненный биоптат печени: многочисленные цитотоксические лимфоциты (обозначены стрелками), разрушающие гепатоциты. Увеличение: объектив 100; окуляр. 10. Окраска: азур II, основной фуксин

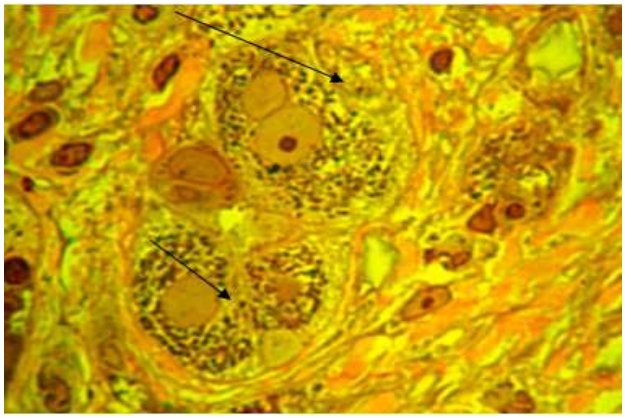


Рисунок 3 — Прижизненный биоптат печени (ко-инфекция ВИЧ/ВГС): гепатоциты (обозначены стрелками) с гипертрофией митохондриального аппарата, окруженные волокнами соединительной ткани (окрашены в красный цвет). Увеличение: объектив 100; окуляр. 10. Окраска: Окраска: азур II, основной фуксин

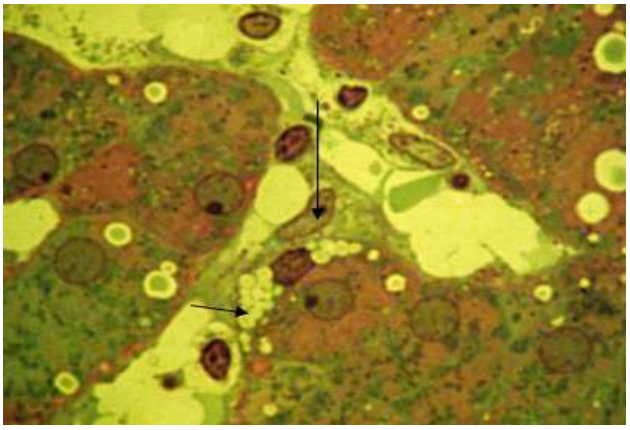


Рисунок 4 — Прижизненный биоптат печени: тесный контакт макрофага (обозначен большой стрелкой) с липоцитом (обозначен маленькой стрелкой). Увеличение: объектив 100; окуляр. 10. Окраска: азур II, основной фуксин

Фиксация исследуемых тканей печени при помощи раствора глютарового альдегида (на боратном буфере) в качестве фиксирующего агента, позволяет приготавливать тонкие срезы тканей для световой микроскопии, которые хорошо окрашиваются различными красителями. [2]. Однако глютаровый альдегид, применяемый без других фиксирующих агентов, не способен стабилизировать липидные молекулы мембран и внутриклеточные включения липидов, что существенно снижает разрешающую способность метода.

Способ фиксации биоптатов последовательно в 4% растворе параформальдегида на 0,2–0,4 М фосфатном буфере с добавлением глютарового альдегида и 2,4,6-тринитрофенола и в 1% растворе

четырех окиси осмия применяется для последующего электронномикроскопического исследования биопсийного материала [3]. Данный фиксатор обеспечивает фиксацию (стабилизацию) только поверхностного слоя ткани, так как он настолько эффективен, что препятствует проникновению фиксирующего раствора вглубь биоптата. Хорошее сохранение структуры при иммерсионной фиксации ткани происходит только в поверхностном слое и небольшом по объему (1 мм$^3$) кусочке биоптата. В остальной части ткани при фиксации глютаровым альдегидом и четырех окисью осмия, появляются артефакты в виде экс- и инвагинаций, волдырей, миелиноподобных фигур, набухания митохондрий и др. Электронномикроскопическое исследование сопряжено с рядом трудностей, среди которых необходимость приобретения дорогостоящего оборудования, реактивов и подготовка высококвалифицированных специалистов.

Недостатком способ фиксации биоптатов печени в фиксаторе по Sato Taizan [4] является то, что слабо окрашивается соединительная ткань и при последующей светооптической микроскопии ткани печени не выявляются внутриклеточные структуры.

**Выводы.** Таким образом, данный способ фиксации биоптата печени предполагает последовательное использование нескольких фиксирующих смесей, что позволяет достичь стабилизации структуры тканей в большом объеме биоптата, устранить автолиз в глубине образца и дает возможность для визуальной дифференцировки популяций клеток печени после окраски.

Преимуществами данного способа являются:

• обеспечение хорошей сохранности и контрастной окраски клеток и внеклеточного матрикса, с возможностью дифференцировки различных типов синусоидальных и паренхиматозных клеток, визуализации внутриклеточных органелл и включений;

• возможность изучения больших кусочков биоптата, выполнять дополнительно количественный учет патоморфологических изменений, что повышает достоверность оценки результатов;

• предложенный метод фиксации не требует специального дорогостоящего оборудования, экономичен.

**Литература**

1. Покровский, В.И. Хронический гепатит С: современные представления о пато- и морфогенезе. Концепция антивирусной стратегии гепатоцитов / В.И. Покровский, Г.Т. Непомнящих, Н.П. Толоконская // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. — 2003. — Т. 135, № 4. — С. 364–376.

2. Mauthner, T. Extended-life tissue fixative composition and method of using the same / T. Mauthner; Cambridge Chemical Products Inc.: пат. 4404181, США; заявл.15.10.81, № 311682; опубл. 13.09.83. МКИ G 01 N 1/28, НКИ 424/3.

3. Ito, S. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompounds / S. Ito, M.J. Karnovsry // Cell. Biol. — 1968. — № 39. — P. 168A–169A.

4. Taizan, S. An electron microscopic study of specimen fixed for longer periods in phosphate buffered formalin / S. Taizan, T. Isamu // J. Electron Microsc. — 1982. — Vol. 31, № 4. — P. 423–428.

## FIXATION OF LIVER TISSUE

**Andreev V.P., Tsyrkunov V.M., Matsiyeuskaya N.V.**

*Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

The method for fixing the lifetime liver biopsy specimens by sequential use of several fixation mixtures is presented. The method resulted in stabilization of liver tissue structure in large volume of samples, eliminated autolysis in the depth of the sample and allowed for visual differentiation of liver cells population by light microscopic examination

**Keywords:** tissue fixation, liver biopsy, pathomorphologycal investigation, light microscopy

Поступила 06.09.2013

# ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ В ЕВРОПЕЙСКОМ РЕГИОНЕ

**Шиманович В.П.[1], Самойлович Е.О.[2]**

*[1]Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;*

*[2]РНПЦ эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Целью настоящего исследования явился анализ заболеваемости эпидемическим паротитом в странах Европейского региона в довакцинальный период и последнее десятилетие. Проведенный анализ показал, что внедрение в 80-х годах XX столетия иммунизации против эпидемического паротита позволило существенно снизить заболеваемость инфекцией, а в некоторых странах достичь уровня менее 1 на 100 000. В странах с низким уровнем вакцинации отмечались вспышки эпидемического паротита среди школьников и студентов.

**Ключевые слова:** эпидемический паротит, заболеваемость, вакцинация.

**Введение.** Эпидемический паротит (от греческих «para» — около и «us», родительный падеж «otus» — ухо) — острое антропонозное вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, общей интоксикацией, увеличением одной или нескольких слюнных желез, нередко поражением других органов и центральной нервной системы.

Возбудителем инфекции является РНК-содержащий вирус эпидемического паротита, принадлежащий к роду *Rubulavirus* семейства *Paramyxoviridae*. Описано 12 генотипов вируса эпидемического паротита, обозначенных буквами от A до L, и их географическое распределение: в западном полушарии преобладают генотипы C, D, E, G, H, в азиатских странах — генотипы B, F. Несколько генотипов может одновременно циркулировать в регионе, может иметь место распределении генотипов по времени [1, 2, 3].

Эпидемический паротит является вакциноуправляемой инфекцией. На территории Европейского региона иммунизация с использованием живой аттенуированной паротитной вакцины внедрена в 80-х годах XX столетия.

**Целью** настоящего исследования явился анализ заболеваемости эпидемическим паротитом в довакцинальный и вакцинальный периоды в странах Европейского региона.

*Материалы и методы.* Проведен обзор доступной нам научной литературы о заболеваемости эпидемическим паротитом в странах Европейского региона, а также анализ заболеваемости паротитом в Республике Беларусь.

**Результаты и их обсуждение.** В довакцинальную эру эпидемический паротит был широко распространенной инфекцией, межэпидемические периоды составляли 4–5 лет. В Европейском регионе в среднем ежегодно регистрировалось более 100 случаев на 100 тыс. населения. Так, в Дании средний многолетний годовой показатель заболеваемости составил 726 на 100 тыс. населения, в Финляндии — 223, Норвегии — 371, Хорватии — 101, Израиле — 102, Латвии — 141, Польше — 415. Наиболее поражаемой группой во всех странах были дети в возрасте 5–7 лет [4].

В Республике Беларусь до начала вакцинации отмечалась также очень высокая заболеваемость эпидемическим паротитом, которая была сравнима с заболеваемостью в других странах региона, средний многолетний годовой показатель заболеваемости составлял 269,5 на 100 тыс. населения [5].

Внедрение вакцинации изменило эпидемиологическую картину заболеваемости эпидемическим паротитом. Использование однодозовой схемы иммунизации снизило заболеваемость инфекцией более чем на 88%. Применение двухдозовой иммунизации при поддерживающем высоком уровне охвата профилактическими прививками обеспечило дальнейшее снижение заболеваемости более чем на 97%, а в некоторых странах (Дания, Финляндия, Эстония, Венгрия, Швеция, Австрия, Норвегия, Словакия, Беларусь) показатель достиг уровня менее 1 на 100 000 населения. В странах с низким уровнем вакцинации отмечалось большое количество серонегативных лиц к паротиту среди подростков, что приводило к вспышкам инфекции среди школьников и студентов [6,7].

Широкомасштабная вспышка эпидемического паротита была зарегистрирована в Великобритании в 2004–2005 гг. Количество заболевших составило 56390 человек, 79% из которых были лица в возрасте 15–24 лет, две трети заболевших не были вакцинированы. В 2007–2008 гг. в Республике Молдова было выявлено почти 20000 случаев эпидемического паротита, в основном также сре-

ди лиц в возрасте 15–24 лет. Большинство пациентов (96%) были вакцинированы против паротита однократно. Выделенный от пациентов генотип вируса паротита G5 был обнаружен в это время и в ряде других стран, включая Хорватию, Данию, Германию, Великобританию и Израиль [8,9].

В Республике Беларусь, также как и в странах Европы, внедрение вакцинации против эпидемического паротита и переход на двухдозовую иммунизацию способствовало снижению заболеваемости. Применение однодозовой иммунизации (1980–1999 гг.) позволило снизить заболеваемость эпидемическим паротитом на 92,4%. Проведение двухдозовой иммунизации (2000–2012 гг.) с обеспечением уровня охвата профилактическими прививками не менее 95% способствовало снижению заболеваемости на 99,6% [5]. Какой генотип вируса был эндемичным для нашей страны в довакцинальный период и первые годы приенения вакцинации не известно. Единственное исследование по генотипированию вируса паротита, циркулирующего в Беларуси, было выполнено в 2001–2003 гг., когда были изучены вирусы, выделенные от пациентов с эпидемическим паротитом, госпитализированных в Минскую инфекционную клиническую больницу. В 22 случаях был идентифицирован вирус паротита генотипа H1 [10]. С 2010 г. показатель заболеваемости эпидемическим паротитом составлял менее 1 на 100 тыс. населения. В 2013 г. в течении 8 месяцев в Беларуси зарегистрирован единственный случай эпидемического паротита. По эпидемиологическим данным этот случай классифицирован как завозной (из Чехии). Проведенное в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии молекулярно-генетическое исследование вируса от этого пациента показало, что он относится к генотипу G.

**Литература**

1. Hviid, A. Muhlemann K. Mumps / A. Hviid, S. Rubin // Lancet. — 2008. — Vol. 371. — P. 932–944.

2. Muhlemann, K. The molecular epidemiology of mumps virus / K. Muhlemann // Infect. Genet. Evol. — 2004. — Vol. 4. — P. 215–219.

3. Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes / Y. Inou [et al.] // J. Med. Virol. — 2004. — Vol. 73. — P. 97–104.

4. Galazka, A.M. Mumps and mumps vaccine: a global review / A.M. Galazka, S.E. Robertson, A. Kraigher // Bull. World Health Organization. — 1999. — Vol. 77, № 1. — P. 3–14.

5. Шиманович, В.П. Влияние иммунизации на заболеваемость эпидемическим паротитом / В.П. Шиманович, Е.О. Самойлович // Здравоохранение. — 2011. — № 12. — С. 47–50.

6. Sero-epidemiology of mumps in western Europe / A. Nardone [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2003. — Vol. 131. — P. 691–701.

7. Annual epidemiological report. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data // ECDC. — Mode of acssess: http://www.ecdc.europa.eu.

8. Mumps outbreak ongoing since October 2007 in the Republic of Moldova / H. Bernard [et al.] // Eurosurveillance. — 2008. — Vol. 13, № 13. — Mode of acssess: http://www.eurosurveillance.org.

9. Mumps outbreak in Jerusalem affecting mainly male adolescents /C. Strein-Zamir [et al.] // Eurosurveillance. — 2009. — Vol. 14, № 50. — Mode of acssess: http://www.eurosurveillance.org.

10.Investigation of mumps vaccine failures in Minsk, Belarus, 2001–2003 / A.V. Atrasheuskaya [et al.] // Vaccine. — 2007. — Vol. 25. — P. 4651–4658.

## MUMPS IN THE EUROPEAN REGION

**Shimanovich V.P.[1], Samoilovich E.O.[2]**

*[1]State Republican Center of Hygiene, Epidemiology & Public Health;*

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

The aim of this work was to analyze the incidence of mumps before vaccination and during recent decade in the European region. The analysis showed that the introduction of immunization against mumps in the 80th years of XX century could reduce the incidence of infection substantially and in some countries the mumps incidence reached a level of less than 1 per 100,000 population.. Outbreaks of mumps among students were observed in the countries with a low level of vaccination. Introduction two-doses vaccination schedule allowed to reduce the mumps incidence of less than 1 in 100.000 from 2010 in the Republic of Belarus.

**Keywords:** mumps, incidence, vaccination.

Поступила 04.09.2013

# ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОБОЧНЫХ РЕАКЦИЙ НА ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИН НАЦИОНАЛЬНОГО КАЛЕНДАРЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРИВИВОК

**Шмелева Н.Д., Коломиец Н.Д.**

*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Проведен ретроспективный анализ 565 случаев поствакцинальных осложнений зарегистрированных в Республике Беларусь за 1990–2013 гг. Определена тенденция в многолетней динамикепоствакцинальных осложнений, структура нозологических форм и вакцин, после введения которых возникли осложнения. Выявлена доля поствакцинальных осложнений связанных с ненадлежащей практикой иммунизации. Разработаны эпидемиологические требования, направленные на предотвращение поствакцинальных осложнений.

**Ключевые слова:** побочная реакция, поствакцинальное осложнение, вакцина, иммунизация, профилактическая прививка.

**Введение.** Эпидемиологический надзор за проведением профилактических прививок предусматривает не только контроль уровней охвата населения профилактическими прививками, но и контроль безопасности проведения иммунизации. Поствакцинальные осложнения относятся к редко встречающимся заболеваниям: по статистике ВОЗ частота серьезных побочных реакций (поствакцинальных осложнений) колеблется от 0,4 случая (вакциноассоциированный полиомиелит) до 1000 случаев на миллион введенных доз вакцины (гнойные лимфадениты, оститы после БЦЖ) [2, 5]. Но даже при такой частоте должен учитываться этический аспект: профилактические прививки проводятся здоровым пациентам, в связи с чем риск неблагоприятных последствий от проведения данного медицинского вмешательства должен быть сведен к минимуму. Система эпидемиологического надзора за поствакцинальными реакциями и осложнениями предусматривает выявление и регистрацию всех побочных реакций после проведения профилактических прививок с целью их идентификации, оценки причин появления и принятия мер по предупреждению на локальном уровне.

**Целью** исследования является эпидемиологическая характеристика побочных реакций на профилактические прививки на основании эпидемиологической оценки многолетней динамики, существующей тенденции изменения частоты поствакцинальных осложнений, структуры нозологических форм и причин, на основании которых возникли поствакцинальные осложнения.

**Материалы и методы.** Для определения динамики, многолетней тенденции и структуры поствакцинальных осложнений были использованы данные форм ведомственной статистической отчетности: «Сведения о поствакцинальных реакциях и осложнениях», «Отчет о количестве вакцинированных детей и движении иммунобиологических препаратов», «Журнал учета инфекционных заболеваний, пищевых отравлений, осложнений после прививки» за 1990–2013гг. государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья». Для анализа основных закономерностей развития поствакцинальных осложнений и выявления причин их появления взяты данные, зафиксированные вовнеочередных донесениях и актах расследования поствакцинальных осложнений государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

Определение прямолинейной многолетней эпидемической тенденции проводилось методом наименьших квадратов.Достоверность полученной эпидемической тенденции оценивалась по критерию Стьюдента. Частота поствакцинальных осложнений рассчитывалась на миллион введенных доз вакцины для сопоставления с показателями ВОЗ.

**Результаты и их обсуждение.** В существующей в настоящее время в Республике Беларусь терминологии обозначений неблагоприятных событий в поствакцинальном периоде различают: побочные реакции, серьезные побочные реакции, поствакцинальные реакции и поствакцинальные осложнения. В международной классификации побочные реакции после вакцинации — это медицинское явление или инцидент, который имеет место после иммунизации, но не обязательно вызван вакцинацией, серьезные побочные реакции — соответствует определению серьезная побочная реакция используемому в нормативной базе Республики Беларусь, а также не противоречит определению «поствакцинальное осложнение». В связи с этим нами сопоставлены термины рекомендуемые ВОЗ с рекомендуемыми в нашей стране (таблица 1).

Таблица 1 — Сопоставление терминологии обозначающей нежелательные события после иммунизации

| Позиция ВОЗ | Регистрация в ЦГЭ (РБ) | Терминология при оценке качества ИЛС (РБ) |
|---|---|---|
| Частые легкие побочные реакции | Поствакцинальные реакции | Побочные реакции |
| Редкие и серьезные побочные реакции | Поствакцинальные осложнения | Серьезные побочные реакции |
| Программные ошибки неправильной практики иммунизации | | Не подлежат учету |

В соответствии с международной классификацией ВОЗ отдельно выделяют группу заболеваний, обусловленных ошибками неправильной практики иммунизации, которая не подлежит учету в национальной системе оценке качества ИЛС, однако должна подвергаться расследованию со стороны органов государственного санитарного надзора так как связана с нарушениями в процессе проведения профилактических прививок.

На наш взгляд международная классификация ВОЗ является наиболее четкой, поскольку изначально разграничивает случаи, обусловленные неправильной практикой иммунизации, которые не связаны со свойствами и качеством ИЛС и не зависят от состава вакцины или других ее характеристик, а обусловлены ненадлежащим ее использованием. Ненадлежащее хранение и использование вакцины влечет однотипные заболевания независимо от названия вакцины и ее производителя. Это, как правило, сильные реакции, инфильтраты либо абсцессы.

В соответствии с позицией ВОЗ частые легкие реакции являются специфичными для каждого вида вакцины и представляют ожидаемое явление, проходящее без медицинского вмешательства, для характеристики были взяты случаи побочных реакций, сопровождающиеся возникновением заболеваний — поствакцинальные осложнения (ПВО). Случаи поствакцинальных осложнений, зарегистрированные в 1990–2013 гг. (n=565), были разделенына на 2 группы: осложнения на БЦЖ вакцины (n=473) и осложнения на прочие вакцины (n=92). Иих распределение представлено на рисунке 1.

Рисунок 1 — Изменение динамики количества случаев поствакцинальных осложнений за 1990–2013 гг. в Республике Беларусь

Отмечено, что до 1998 г. регистрировались только случаи осложнений, связанные с введением БЦЖ вакцин. С 1999 г. информация стала поступать и о случаях ПВО на другие вакцины. В период 2006–2010 гг. количество случаев БЦЖ-осложнений возросло по отношению к предыдущему промежутку времени и затем в период с 2011 г. и за первое полугодие 2013 г. снова произошло снижение числа случаев БЦЖ-осложнений. Количество случаев осложнений на другие виды вакцин подвергалось незначительным колебаниям.

Многолетняя тенденция регистрации поствакцинальных осложнений в Республике Беларусь характеризуется выраженной линейной тенденцией к росту, темп роста за период 1999–2010 гг. составляет 105,2% с ежегодным приростом 5,2 %. При этом наблюдаются 2 завершенных периода колебаний с фазой роста в течение 3 лет (2000–2003 и 2005-2007 гг.) и фазой снижения в 1 и 3 года (2004, 2008–2010 гг.).

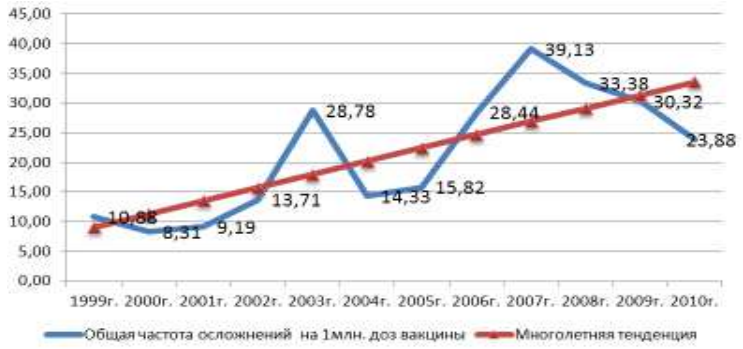



Рисунок 2 — Многолетняя эпидемическая тенденция изменения частоты поствакцинальных осложнений за 1999–2010 гг. в Республике Беларусь

В структуре случаев поствакцинальных осложнений превалируют заболевания, возникшие после введения противотуберкулезных вакцин — 83,72% (473 случая), второй по значимости является доля осложнений после вакцинации комплексными коклюшно-дифтерийно-столбнячными вакцинами — 11,85% (67 случаев), и на третьем месте — заболевания после иммунизации дифтерийно-столбнячным анатоксином АДС (1,46%, 8 случаев). Все остальные случаи поствакцинальных осложнений занимают незначительный удельный вес в общей структуре — до 1% (0,18– 0,88%, или 1–5 случаев).

Поскольку поствакцинальные осложнения не всегда связаны с введением вакцины, а могут возникнуть вследствие ненадлежащей практики иммунизации или так называемых технических ошибок при проведении процедуры вакцинации, нами проведен дополнительный анализ. Обычно к техническим ошибкам относят: нарушение стерильности инъекции, недостаточное встряхивание вакцины перед использованием, инъекцию в ненадлежащее место, введение БЦЖ подкожно либо внутримышечно, недостаточно глубокое введение АКДС/АДС/АС, инъекция в ягодицу, ненадлежащее транспортировка/хранение вакцины.

Каждое из перечисленных нарушений влечет развитие строго определенных нозологических форм (таблица 2), что позволяет по регистрируемым нозологическим формам осложнений выявить ведущие причины и сформулировать санитарно-эпидемиологические требования к организации процесса вакцинации на уровне учреждений здравоохранения.

В соответствии с приведенной таблицей осложнения на введение противотуберкулезных вакцин были разделены на категории: серьезные побочные реакции и осложнения вследствие нарушения техники введения вакцины БЦЖ. К первой группе были отнесены оститы и подмышечные и подключичные лимфадениты — 342 случая, ко второй гнойные лимфадениты и холодные абсцессы, подкожные инфильтраты — 127 случаев.

Таблица 2 — Возможные мероприятия по предотвращению технических ошибок*

| Нозологические формы | Ненадлежащая/неправильная практика | Мероприятия по профилактике* |
|---|---|---|
| | ***Нестерильная инъекция*** | |
| Инфицирование:<br>абсцесс в месте инъекции;<br>передача с кровью возбудителей инфекции (гепатитов В и С, ВИЧ);<br>сепсис, синдром токсического шока или смерть | Повторное использование одноразового шприца или иглы.<br>Контаминация шприца и иглы<br>Использование загрязненной вакцины или растворителя.<br>Повторное использование разведенной вакцины при проведении последующей прививочной сессии | *Требования к оснащению прививочного кабинета, утилизации остатков ИЛС, режиму дезинфекции* |
| | **Ошибка при разведении вакцины** | |
| Локальный абсцесс<br>Неэффективная вакцина | Недостаточное встряхивание вакцины<br>Разбавление несоответствующим растворителем | *Требования к проведению профилактических прививок* |

Окончание таблицы 2

| | | |
|---|---|---|
| ***Инъекция в ненадлежащее место*** | | |
| Локальная реакция или абсцесс<br>Гнойный лимфаденит<br>Локальная реакция или абсцесс<br><br>Повреждение седалищного нерва | Введение БЦЖ подкожно<br>Введение БЦЖ внутримышечно<br>Недостаточно глубокое введение АКДС/АДС/АС<br>Инъекция в ягодицу | *Требования к квалификации и подготовке медицинских работников* |
| ***Ненадлежащая транспортировка/хранение вакцин*** | | |
| Локальная реакция, вызванная замороженной вакциной | Изменение цвета ФТИ<br>Адсорбированная вакцина с плотным осадком | *Требования к транспортировке и хранению ИЛС в организации здравоохранения* |

Примечание. * — результаты исследований автора

Оститы относятся к крайне редким и тяжелым формам поствакцинальных осложнений и встречаются в мире с частотой от 100 до 1000 на 1 млн введенных доз вакцины БЦЖ [5].По данным некоторых литературных источников, оститы связаны с нарушением медицинских противопоказаний, либо с наличием в анамнезе новорожденного органических поражений ЦНС, либо гипоксии в процессе родов [6]. В Республике Беларусь за период 2006–2013 гг. (регистрация начата с 2006 г.)зарегистрировано 82 случая остита. Частота случаев на 1 млн доз вакцины составила от 58,9 до 122,1 случая, что находится на уровне нижней границы в соответствии мировой статистикой.

Учитывая то, что вакцинация против туберкулеза проводится в возрасте 3–5-е сут рождения ребенка, не все противопоказания к вакцинации могут быть выявлены в первые несколько суток после рождения. Так анализ оститов по месту проведения вакцинации показал, что из 82 случаев БЦЖ-осложнений 80 (97,5%) связаны с проведением вакцинации в учреждениях родовспоможения.Среди детей с диагнозом остит, 73 (89%) были привиты вакциной БЦЖ, к которой 15 (18,3% от всех диагнозов остит) детей имели противопоказания (2 группа здоровья была установлена позже, после выписки из роддома). В 17 случаях (20%) указывалось на патологию ЦНС либо гипоксию при рождении.

Лимфадениты являются наиболее легкой и доброкачественно протекающей формой поствакцинального осложнения после БЦЖ-вакцинации. Частота этой нозологической формы осложнений также определяется на уровне 100–1000 случаев на 1 млн доз вакцины [3, 4]. За период с 2007 –2012 гг. частота лимфаденитов колебалась в пределах 75–460 случаев на 1 млн доз.

За весь изучаемый период было зарегистрировано 258 случаев лимфаденитов. В роли причины данного вида осложнения по разным источникам может выступать нарушение процедуры встряхивания многодозного флакона либо само качество вакцины [6]. При анализе количества случаев на одно учреждение было выявлено, что за изучаемый промежуток в 6 учреждениях возникло по 5 случаев лимфаденитов и еще в двух учреждениях здравоохранения 8 и 16 случаев за весь период регистрации.

БЦЖ-осложнения, возникшие вследствие нарушения техники введения — холодные абсцессы, представляющие собой заболевания, возникающие вследствие подкожного введения живой аттенуированной вакцины БЦЖ. За изучаемый период было зарегистрировано 113 случаев холодных абсцессов. По месту проведения профилактических прививок распределение случаев холодных абсцессов было примерно одинаковым: 45,1% (51 случай) всех случаев холодных абсцессов возникло после проведения прививок в амбулаторно-поликлинических учреждениях и 54,9% в учреждениях родовспоможения. При расчете частоты возникновения поствакцинальных осложнений по видам учреждений установлено, что холодные абсцессы в амбулаторно-поликлинических учреждениях возникают чаще, чем в учреждениях родовспоможения. В амбулаторно-поликлинических учреждениях частота составила 1 случай на 1714–2571 введение вакцины, а в учреждениях родовспоможения в 1 случае на 7918–32033 введений вакцины БЦЖ.Из 113 случаев 52 (46,1%) связаны с одними и теми же 9 организациями здравоохранения, где возникало от 3 до 9 случаев на одно учреждение.

Все поствакцинальные осложнения на другие виды вакцин (n=93) также можно разделить условно на 2 группы: серьезные побочные реакции на вакцины и осложнения, обусловленные тех-

ническими ошибками. В первую группу для анализа выделено 46 случаев с нозологическими формами: анафилактический шок, аллергические реакции, судорожный синдром, энцефалическая реакция, энцефалит, энцефалопатия, тромбоцитопеническая пупура. Наибольшие доли в структуре нозологических форм занимают анафилактический шок, аллергические реакции и судорожный синдром — 20, 17 и 22% соответственно.

| Группа ПВО | Кол-во | Удельный вес в общей структуре осложнений (n=565), % | ИЛС, на которые возникло ПВО | Относительная частота регистрации на 1 млн прививок | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | В РБ | По данным ВОЗ |
| *Серьезные побочные реакции* | | | | | |
| Анафилактический шок | 8 | 1,4±0,5% | АКДС | 3 | 1–6 |
| | | | АДС-м | 3 | |
| | | | АС | 10** (1:94356) | |
| Анафилаксия (отек квинке, крапивница) | 7 | 1,2±0,47% | Тримовакс | 3 | 1 |
| | | | НВ-вакс | 2 | 1–2 |
| | | | Тетракт-Хиб | 1 | 1–6 |
| | | | ИГВ | 1 | 1 |
| Остит | 82 | 14,5±1,48% | БЦЖ,БЦЖ-М | 58–122 | 100–1000 |
| Лимфаденит | 342 | 60,5±2,1% | БЦЖ,БЦЖ-М | | |
| Пронзительный крик | 6 | 1,1±0,43% | АКДС | 18 | 100–60000 |
| | | | Тетракт-Хиб | | |
| Судорожный синдром, энцефалопатия | 10 | 1,8±0,55% | АКДС | 30 | 330–600 |
| | | | Тетракокк | | |
| | | | Эбербиовакс | | |
| | | | НВ-вакс | | |
| Энцефалит | 3 | 0,5±0,31% | АКДС | 6 | 1 |
| Энцефалическая реакция | 5 | 0,9±0,39% | АКДС | 15 | 30–330 |
| | | | Тетракокк | | |
| *Технические ошибки вакцинации* | | | | | |
| Холодный абсцесс | 127 | 22,5±1,76% | БЦЖ,БЦЖ-М | 1: 1714–1:32033 | Информация отсутствует |
| Постинъекционный абсцесс | 46 | 8,1±1,15% | После всех ИЛС с в/м способом введения | 1:47 428 | |
| Сильная местная реакция (инфильтрат) | 8 | 1,4±0,5% | АКДС | 1: 41500 | |
| | | | Тетракокк | | |
| | | | Тетракт-Хиб | | |
| | | | ИПВ | | |

** — объем вакцинации меньше 1 млн доз в год

Анафилактический шок регистрировался у детей после второй вакцинации АКДС вакциной 4 случая, а у взрослых после повторного введения АДС-м — 4 случая и один случай возник на первое введение АКДС. Аллергические реакции были связаны с различными вакцинами: на вакцину Тримовакс при первичном введении у детей в возрасте 1 года — 3 случая, на вакцины Тетракт-Хиб, инактивированную гриппозную, НВ-вакс, столбнячный анатоксин (частота приведена в таблице 3).

Все случаи осложнений, проявляющихся поражениями со стороны нервной системы, были связаны с введением комплексных вакцин содержащих цельноклеточный коклюшный компонент. Все случаи судорожного синдрома возникли во взаимосвязи с фактом повышения температуры до 38,3–40°С в 1–3-е сут после проведенной прививки у 90,9% детей с данной формой осложнений. Все дети с данной формой осложнения имели в анамнезе риск развития патологии центральной нервной системы.

Во вторую группу вошли 46 постинъекционных абсцессов и сильных реакций. Все случаи постинъекционных абсцессов возникли после введения адсорбированных ИЛС: АКДС, Тетракт-Хиб, Тетракокк и АДС-м. Постинъекционные абсцессы возникали при введении коклюшно-дифтерийно-столбнячных комплексных вакцин — 39 (92,3+4,3%) случаев, дифтерийно-столбнячных анатоксинов — 5 (5,1+3,5%) и в одном случае после введения вакцины Акт-Хиб. Во всех случаях постинъек-

ционный абсцесс начинался как местная реакция в виде гиперемии диаметром 1,5–5 см, инфильтрата или уплотнения, сопровождающихся болезненностью на 1–2-е сут после прививки и в 8 (20,5+6,5%) случаях сопровождался повышением температуры до 37,5–39,0°С. При проведении профилактических прививок адсорбированными ИЛС местные проявления возникают довольно часто — до 50,0% случаев [3]. В отличие от местной побочной реакции клинические проявления абсцесса не исчезают к четвертым суткам, что наблюдалось во всех зарегистрированных случаях.

Развитие постинъекционных абсцессов происходило чаще у детей — 36 (92,3+4,3%) случаев, чем у взрослых. По нескольку случаев (2–5) постинъекционных абсцессов на одно учреждение возникали в 9 организациях здравоохранения, что вероятно связано с организацией условий проведения профилактических прививок.

Таким образом, регистрируемые нозологические формы условно можно разделить по видам причин развития на следующие группы: заболевания, обусловленные ненадлежащей практикой иммунизации, и серьезные побочные реакции после введения ИЛС:

**Выводы.** В многолетней динамике регистрации поствакцинальных осложнений за период 1999–2010 гг. в Республике Беларусь наблюдается достоверная прямолинейная выраженная тенденция к росту с темпом роста 105,2% и темпом прироста 5,2% в основном за счет осложнений, связанных с введением противотуберкулезных вакцин. Среди зарегистрированных поствакцинальных осложнений можно выделить 2 группы: серьезные побочные реакции (68±1,96%) и заболевания вследствие ненадлежащей практики иммунизации (технические ошибки при проведении профилактических прививок) — 32±1,96%, что целесообразно закрепить в терминологии для учета и определению подходов к дальнейшему расследованию осложнений. Заболевания второй группы возможно предотвратить путем внедрения эпидемиологических требований и контроля за их исполнением.

**Литература**

1. Кожухова, Е.А. Контроль безопасности вакцинопрофилактики: международные стандарты и целесообразность интеграции с действующей национальной системой / Е.А. Кожухова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2003. — № 4 (11).

2. Иммунопрофилактика–2005: справочник / Под ред. В.К. Таточенко, Н.А. Озерцовского. — 7-е изд., доп. — М., 2005. — 192 с.

3. Поствакцинальные осложнения: пособие для практ. врача / Е.А. Лакоткина [и др.]. — М., 2004. — 80 с.

4. Supplementary information on vaccine safety. Part 1: Field issues. — Geneva, World Health Organization, 2000.

5. Supplementary information on vaccine safety. Part 2: Background rates of adverse events following immunization. — Geneva, WorldHealthOrganization, 2000.

6. Pan-american organization of the public health Regional agency Worldwide organization of the vaccine Division public health and immunizations, safety to immunizations, What necessary to do at development reaction, in accordance with vaccination or immunization supposedly. — Washington, 2002.

## EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ADVERSE EVENTS VACCINATION TO THE VACCINE OF NATIONAL CALENDAR

**Shmeleva N.D., Kolomiets N.D.**

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

A retrospective analysis of 565 cases of post-vaccination complications registered in the Republic of Belarus for 1990 to 2013. Identify trends in the long-term dynamics of post-vaccination complications, the structure of clinical entities and vaccines, following the introduction of which there were complications. Spotted share of post-vaccination complications associated with the improper practice of immunization. Designed epidemiological requirements for the prevention of post-vaccination complications.

**Keywords:** adverse event, the post-vaccination complications, vaccine, immunization, preventive vaccination.

Поступила 02.09.2013

# СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

**Абрамович М.Л., Плоскирева А.А.**

*Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологи» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия*

**Резюме.** Дан краткий сравнительный обзор существующих интегральных показателей лейкоцитарной формулы крови больных с инфекционной патологией. Предложен новый способ оценки энтропии лейкоцитарной формулы человека, позволяющий объективизировать данные гемограммы у детей с острыми респираторными заболеваниями разной степени тяжести.

**Ключевые слова:** энтропия лейкоцитарной формулы, острые респираторные заболевания, дети.

Перспективность и большой научно-практический потенциал использования интегральных показателей гемограммы подчеркивают многие авторы. Анализ динамики интегральных показателей лейкоцитарной формулы дает возможность улучшить информативность стандартных диагностических тестов, повысить точность оценки эффективности терапии и прогнозирования исходов заболевания, оптимизировать пути лечения и реабилитации с учетом индивидуальной реакции пациента.

Для комплексной оценки лейкоцитарной формулы крови больных с инфекционной патологией применяются различные показатели: лейкоцитарный индекс интоксикации по Я.Я. Кальф-Калифу, индекс сдвига лейкоцитарной формулы и др. Наиболее полно дисбаланс лейкоцитарной системы можно определить путем расчета энтропии лейкоцитарной формулы.

Мерой изменения упорядоченности системы служит изменение энтропии ΔH. Энтропия системы тем выше, чем больше степень неупорядоченности системы. Таким образом, если процесс идет в направлении увеличения неупорядоченности системы, то ΔH — величина положительная.

Для оценки информационной энтропии Шенноном было предложено уравнение, напоминающее классическое выражение энтропии, найденное Больцманом:

$$H = \sum P_i \log_2 1/P_i = -\sum P_i \log_2 P_i \quad (1),$$

где H — энтропия Шеннона;

$P_i$ — вероятность некоторого события.

Это уравнение может быть использовано и для расчета энтропии лейкоцитарной формулы, однако в клинической практике применение данного метода имеет ряд ограничений. В частности, чтобы рассчитываемый показатель не зависел от количества переменных (что как раз может наблюдаться в случае лейкоцитарной формулы, т. к. некоторые ее компоненты, например, юные формы, появляются лишь при определенных патологических состояниях), приходится рассчитывать относительный показатель энтропии:

$$h = H/ H_{max} \quad (2),$$

где h — относительная энтропия лейкоцитарной формулы, %;

H — энтропия лейкоцитарной формулы, определяемая по формуле Шеннона;

$H_{max}$ — максимальное значение энтропии.

Таким образом, в настоящее время отсутствует простой и универсальный способ оценки энтропии лейкоцитарной формулы.

Нами разработан способ оценки энтропии лейкоцитарной формулы человека при инфекционной патологии, в т. ч. у детей с острыми респираторными заболеваниями. Проводят рутинное лабораторное исследование капиллярной крови и определяют отклонения показателей лейкоцитарной формулы от значений, нормальных для данного пола и возраста. Состояние энтропии лейкоцитарной формулы человека оценивают с использованием следующего алгоритма:

$$H= \sqrt{(Me_n-Me_p)^2+(Mi_n-Mi_p)^2+(B_n-B_p)^2+(P_n-P_p)^2+(S_n-S_p)^2+(E_n-E_p)^2+(L_n-L_p)^2+(Mo_n-Mo_p)^2} \quad (3),$$

где H — энтропия лейкоцитарной формулы;

Me — метамиелоциты;

Mi — миелоциты;

B — базофилы;

P — палочкоядерные нейтрофилы;

S — сегментоядерные нейтрофилы;

E — эозинофилы;

L — лимфоциты;

Mo — моноциты (%);

значения показателей n относятся к нормальным для данного пола и возраста, p — к показателям конкретного пациента.

Значение энтропии, равное нулю, говорит о сохранении показателей лейкоцитарной формулы пациентов в пределах возрастных норм, что свидетельствует о сохранение гомеостаза лейкоцитарной формулы и в совокупности с клинической картиной заболевания (например, отсутствием симптомов интоксикации) позволяет оценить состояние больного как удовлетворительное. Значения энтропии больше нуля указывают на нарушения динамического постоянства лейкоцитарной формулы: величина от 0 до 3 единиц соответствует минимальным изменениям в гемограмме, от 3 до 6 единиц — легкой степени изменений, от 6 до 10 — умеренной степени, более 10 — тяжелой. При этом имеется корреляция данного показателя со степенью тяжести инфекционного заболевания.

Указанный способ может с успехом применяться в педиатрической практике, т. к. конечное значение энтропии лейкоцитарной формулы не зависит от возраста пациента: возрастные характеристики гемограммы необходимо учитывать только непосредственно в расчете, используя соответствующие нормы, в то время как другие известные способы интегральной оценки лейкоцитарной формулы либо требуют специальных перерасчетов, исходя из возрастных изменений гематологических показателей, либо вообще не предназначены для использования в педиатрии. Кроме того, предложенный способ позволяет эффективно оценивать отклонения в лейкоцитарной формуле на ранних субклинических стадиях заболевания, когда минимальные изменения гемограммы зачастую недооцениваются врачами.

## MODERN APPROACHES TO ASSESSMENT OF HEMATOLOGIC INDICATORS IN CHILDREN WITH ACUTE RESPIRATORY DISEASES

**Abramovich M.L., Ploskireva A.A.**

*Federal Budget Institution of Science «Central Scientific-Research Institute of Epidemiology» of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow, Russia*

Brief comparative review of available leukogram integrative indicators for patients with infectious diseases is given. New method for assessment of human leukogram entropy, enabling to objectify haemogram data in children with acute respiratory diseases, is proposed.

**Keywords:** leukogram entropy, acute respiratory diseases, children.

Поступила 02.09.2013

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА У ПАЦИЕНТОВ С ХЛАМИДИЙИНДУЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ГЛАЗ

**Алексейчик Д.С., Сапко Т.Г.**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Был определен уровень общего холестерина у пациентов с хламидийиндуцированной патологией глаз и произведено сравнение с двумя контрольными группами. Также выявлены гендерные различия в течении хламидийиндуцированной патологии. Более низкие показатели общего холестерина у мужчин с хламидийной инфекцией могут быть связаны с более тяжелым течением и присоединением аутоиммунного компонента заболевания.

**Ключевые слова:** общий холестерин, хламидийиндуцированная патология глаз.

По статистике ВОЗ ежегодно хламидиозом в мире заболевает порядка 100 млн человек, а число инфицированных хламидиями людей на всем земном шаре достигает одного миллиарда. На сегодняшний день в индустриальных странах инфекции, связанные с *Chlamidia trachomatis*, относят к разряду наиболее распространенных форм урогенитальной патологии человека.

Хламидии в процессе своего существования в организме человека ведут к развитию различного рода патологий путем деструктивных изменений клеток (цитопатическое действие), в ходе которого возможно развитие следующих заболевания: уретрит, везикулит и т. д. В тех случаях, когда повреждающий фактор не удается удалить или нейтрализовать, развивается хроническое воспаление на основе персистирующего повреждающего агента. В результате наблюдается активация аутоиммунных механизмов процессов, лежащих в основе болезни Рейтера, аутоиммуного поражения глаз (увеитов). Хламидиоиндуцированные увеиты в большинстве своем способны приводить к развитию осложнений таких, как: вторичная глаукома, повреждение зрительного нерва, катаракта, образование рубцовой ткани в глазу (синехии), отслойка или дистрофия сетчатки, слепота. Однако, имеются и другие патологические процессы, индуцированные персистированием хламидий.

В литературе имеется ряд работ, указывающих на достоверные изменения уровня холестерина при различных иммуннодефицитных состояниях [1], психических расстройствах [2–5] и инфекционной патологии. Так, у больных при далеко зашедших стадиях ВИЧ-инфекции отмечается гипохолестеринемия [6–10].

**Цель** исследования: изучить уровень общего холестерина у пациентов с хламидийиндуцированной патологией глаз, проанализировать особенности течения заболевания в зависимости от пола.

Материалы и методы исследования: было проведено ретроспективное исследование медицинской документации 437 пациентов, находившихся на лечении в 1-м и 2-м отделениях микрохирургии глаза на базе 10 ГКБ г. Минска с 1 января 2010 г. по 1 января 2012 г.

Критериями включения явились: 1) патология глаз (воспаление сосудистой оболочки глаз); 2) наличие в анамнезе верифицированной хламидийной инфекции (артриты, уретриты/вагиниты — методами ПЦР, ИФА). Критериями исключения явились: 1) наличие других аутоиммунных заболеваний; 2) наличие иного инфекционного фактора (ВИЧ-инфекции, туберкулез и т. д.); 3) посттравматическое поражение глаз.

Исходя из данных критериев, было отобрано 47 человек, у которых были проанализированы: клинико-анамнестические данные, данные иммунограммы, биохимический анализ крови, общий анализ крови, данные биомикроскопии, данные обследования глаз с фундус-линзой.

Учитывая частое поражение опорно-двигательной системы у пациентов с хламидийиндуцированными заболеваниями, в качестве сравнения было сформировано 2 группы: 1-я — практически здоровые (n=32, средний возраст 49,2±1,1 года, женщины 50,0%, мужчины 50,0%). Критерии включения: 1) отрицательные результаты обследования на хламидийную инфекцию; 2) отсутствие соматической патологии.

Вторая группа — пациенты с остеоартрозом (n=54, средний возраст 50,4±1,0 года из них 77,78% мужчин и 22,22% женщин). Критерии включения: 1) верифицированный диагноз остеоартроза; 2) отрицательные результаты обследования на хламидийную инфекцию; 3) отсутствие сопутствующей соматической патологии.

Статистический анализ проводился с помощью пакета программ SPSS 20.0.

**Результаты и их обсуждение.**

Таблица 1 — Клинико-лабораторные данные пациентов в выделенных группах

| | Хламидийиндуцированая патология глаз | | Больные с остеоартрозом | | Практически здоровые | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Параметры | Мужчины, n=36 | Женщины, n=11 | Мужчины, n=42 | Женщины, n=12 | Мужчины, n=16 | Женщины, n=16 |
| Возраст, лет | 32,5±1,8 | 36±2,1 | 50,8±1,2 | 49,1±1,1 | 49,0±1,4 | 49,4±1,3 |
| Вес, кг | 77±2,2 | 64±1,8 | 78±2,3 | 75±1,9 | 75±2,0 | 62±2,7 |
| Рост, м | 1,76±0,2 | 1,68±0,2 | 1,78±0,1 | 1,63±0,1 | 1,74±0,1 | 1,75±0,1 |
| СОЭ, мм/ч | 6,0±0,8 | 9,0±1 | 5,0±0,9 | 8,0±0,9 | 2,0±0,5 | 4,0±1 |
| Холестерин об., ммоль/л | 4,4±0,1 | 6,1±0,2 | 4,5±0,1 | 4,1±0,1 | 3,9±0,2 | 3,7±0,1 |
| Лейкоциты, Ед/л | 9,0±2,0 | 8,0±1,8 | 6,0±1,5 | 5,0±1,7 | 5,0±2 | 4,0±1,1 |
| Гемоглобин, г/л | 152,0±12,2 | 141,0±10,3 | 150,0±10,7 | 138,0±11,0 | 153,0±9,8 | 140,0±10,2 |
| Количество лет болезни | 3,0±1,5 | 2,0±0,9 | 7,0±1,1 | 9,0±1,5 | – | – |

Как видно из приведенной таблицы, самый высокий уровень общего холестерина наблюдался у женщин с хламидийиндуцированным поражением глаз (6,1±0,2 против 4,1±0,1 ммоль/л у больных остеоартрозом и 3,7±0,1 ммоль/л у практически здоровых женщин, $p<0,01$). У мужчин с хламидийиндуцированным поражением глаз уровень общего холестерина был достоверно выше, чем у практически здоровых мужчин (4,4±0,1 против 3,9±0,2 ммоль/л $p<0,01$), но достоверно не отличался у мужчин с остеоартрозом (4,4±0,1 против 4,5±0,1 ммоль/л $p>0,1$).

Далее были проанализированы данные иммуннограм пациентов с хламидийиндуцированным заболеванием глаз.

Таблица 2 — Показатели иммуннограмы

| Параметры | Мужчины, n=36 Me [25%; 75%] | Женщины, n=11 Me [25%; 75%] | p |
|---|---|---|---|
| Иммуноглобулин G, г/л | 16,1 [13;22] | 29,3 [8,6;32] | <0,05 |
| Иммуноглобулин A, г/л | 5,0 [1,9;5,4] | 10,5 [0,9;12,0] | <0,05 |
| Иммуноглобулин M, г/л | 2,0 [1,5;2,3] | 9,6 [1,1;18] | <0,05 |
| Т-лимфоциты (Е-рок) | 68 [65;80] | 61 [58;64] | <0,01 |
| Т-лимфоциты акт | 11 [7,5;17,5] | 13 [12;14] | <0,05 |
| В-лимфоциты | 5,0 [4,0;6,0] | 5,5 [5,0;6,0] | 0,06 |
| Т-супрессоры (CD 8) | 16 [16,0;30,0] | 15 [14;16] | <0,05 |
| Т-хелперы (CD 4) | 32 [30;49] | 27 [24;30] | <0,001 |
| CD 4/CD 8 | 2,0 | 1,8 | <0,01 |
| Титр комплемента | 58 [56;60] | 62,5 [60;65] | <0,05 |
| ЦИК | 8,9 [7,0;10,0] | 8,5 [7;11] | <0,05 |
| ФАК нейтрофилов | 64,5 [42,5;76,5] | 69 [60,0;78,0] | <0,05 |
| ЛКТ | 1,1 [1,0;1,2] | 1,15 [1,1;1,2] | <0,05 |
| ИРИ | 1,0 [0,8;1,6] | 1,3 [1,2;1,4] | <0,05 |

Как видно из приведенной таблицы, у мужчин, в сравнении с женщинами, отмечается статистически значимое повышение соотношения CD4/CD8 (2,0 против 1,8 у женщин, $p<0,01$). Так-

же у мужчин отмечается достоверное увеличение активности Т-супрессоров (16 [16,0;30,0] против 15 [14;16] у женщин, p<0,05), а также увеличение ЦИК (8,9 [7,0;10,0] против 8,5 [7;11] у женщин, p<0,05). У женщин отмечается статистически значимое повышение уровней иммуноглобулинов А и М (10,5 [0,9;12,0] и 9,6 [1,1;18] против 5,0 [1,9;5,4] и 2,0 [1,5;2,3] у мужчин соответственно, p<0,05), титра комплемента (62,5 [60;65] против 58 [56;60] у мужчин, p<0,05), фагоцитарной активности нейтрофилов (69 [60,0;78,0] против 64,5 [42,5;76,5] у мужчин, p<0,05).

В ходе исследования группы пациентов с хламидийиндуцированной патологией были обнаружены гендерные различия в клиническом течении заболевания: у женщин чаще поражается один глаз (наблюдаются преципитаты в камерах глаза, цилиарная болезненность, инъекция конъюнктивы). У мужчин чаще поражаются оба глаза, поражения более выраженные (синехии, рубеоз, вторичная глаукома, катаракта).

У мужчин отмечаются более тяжёлые поражения суставов (полиартриты — в 10% случаев, сакроилеит — в 2.8% случаев) по сравнению с женщинами. У женщин отмечаются моноартриты с преимущественным поражением одного коленного сустава.

У мужчин отмечается поражения мочевыделительной системы (уретрит) — 47%. У женщин отсутствовали данные анамнестические факты. У 14% мужчин в исследуемой группе ранее выставлялась болезнь Рейтера, у женщин данная патология не выявлялась.

Таблица 3 — Оценка различия между группами по частоте исследуемого признака на основе теста $\chi 2$, p — достоверность различий

| Признак | Мужчины/Женщины | |
|---|---|---|
| | $\chi 2$ | p |
| Уретрит | 8,14 | <0,01 |
| Артрит | 3,98 | <0,05 |
| Количество пораженных суставов | 3,44 | <0,05 |
| Поражение глаз | 3,64 | <0,05 |

По результатам проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. Среди пациентов с хламидиоидуцированной патологией поражение глаз наблюдается чаще у мужчин, чем у женщин (77 и 23% соответственно, p<0,05).

2. Статистически значимое различие у мужчин и женщин соотношения CD4/CD8, а также увеличение активности Т-супрессоров, достоверное увеличение у мужчин ЦИК (p<0,05) свидетельствует о преобладании у мужчин аутоиммунного компонента в процессе обострения заболевания, что обуславливает более выраженное поражение суставов (полиартриты) по сравнению с женщинами.

3. Во всех группах сравнения уровень общего холестерина у мужчин достоверно выше, чем у женщин. Однако, в группе с хламидийиндуцированной патологией глаз наблюдается обратное соотношение. Учитывая выводы 1 и 2, можно сделать заключение, что более низкий уровень общего холестерина у мужчин связан с более тяжелым течением заболевания и с более выраженным аутоиммунным компонентом патологического процесса.

**Литература**

1. Immune system differences in men with hypo- or hypercholesterolemia / M.F. Muldoon [et al.] //Clin. Immunol. Immunopathol. — 1997. — Vol. 48, № 2. — P. 145–149.

2. Lower serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in major depression and in depressed men with serious suicidal attempts: relationship with immune-inflammatory markers / M. Maes [et al.] //Acta Psychiatr. Scand. — 1997. — Vol. 95, № 3. — P. 212–221.

3. Serum cholesterol concentrations in parasuicide / M. Gallerani [et al.] // B.M.J. — 1995. — Vol. 310. — P. 632–1639.

4. Davison, K.M. Food intake and blood cholesterol levels ofcommunity-based adults with mood disorders / K.M. Davison, B.J. Kaplan // BMC Psychiatry. — 2012.

5. Elevated sui¬cide risk among patients with multiple sclerosis in Sweden / S. Fredrikson [et al.] //Neuroepidemiology. — 2003. — Vol. 22. — P. 146–152.

6. Serum concentration of acute phase protein and lipid profile in HIV-1 seropositive patients and its relationship to the progression of the disease / P.S. Ogunro [et al.] // Niger Postgrad Med. J. — 2008. — Vol. 15, № 4. — P. 219–224.

7. Low cholesterol? Don't brag yet ... hypocholesterolemia blunts HAART effectiveness: a longitudinal study / M.J. Miguez [et al.] // J Int AIDS Soc. 2010 Jul 13;13:25.

8. Jisun, O. HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment / O. Jisun, R.A. Hegele //Lancet Infect. Dis. — 2007. — Vol. 7. — P. 787–796.
9. Low CD4+ T-cell count as a major atherosclerosis risk factor in HIV-infected women and men / R.C. Kaplan [et al.] // Aids. — 2008. — Vol. 22. — P. 1615–1624.
10. Martı´nez, E. Cardiovascular disease and HIV infection: host, virus, or drugs? / E. Martı´nez, M. Larrousse, J. Gatell // Curr. Opin. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 22. — P. 28–34.

## TOTAL CHOLESTEROL LEVEL IN PATIENTS WITH CHLAMYDIALINDUCED EYE DISEASES

**Aliakseichyk D.S., Sapko T.G.**
*Belorussian State Medical University, Minsk, Belarus*

The aim: to investigate the total cholesterol level in patients with chlamydialinduced eyes' diseases and to see the difference in clinical manifestation between men and women.

Methods: 47 hospitalized patients (36 men and 11 women) with chlamydialinduced eyes' diseases were retrospectively enrolled to the study and assigned to the first group. 54 patients (42 men and 12 women) with osteoarthritis were assigned to the second group. And 32 practically healthy people (16 men and 16 women) were assigned to the third group.

Results: Elevated level of CD4/CD8 (2.0 in men vs 1.8 in women, p<0,01), T-suppressors (16 [16.0;30.0] in men vs 15 [14;16] in women, p<0.05), circulating immune complexes (8.9 [7.0;10.0] in men vs 8.5 [7;11] in women, p<0.05) in men indicates the predominance of autoimmune component in the illness. The depression of total cholesterol level in men with chlamydialinduced eyes' diseases (4.4±0.1 vs 6.1±0.2 mmol/L in women) can be explained by severity of the disease and presents of autoimmune component in the illness.

**Keywords:** total cholesterol level, chlamydialinduced eyes' diseases.

Поступила 04.09.2013

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ КОРРЕЛЯТЫ ПЕРСИСТЕНТНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ МЫШЕЙ BALB/C ШТАММОМ *C. TRACHOMATIS* (СЕРОВАР D)

**Асташонок А.Н., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н.**
*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** С использованием штамма *C. trachomatis* (серовар D) проведено моделирование хламидийной инфекции на мышах Balb/c и изучены ультраструктурные аспекты ее становления при внутривагинальном инфицировании. Методом электронной микроскопии подтверждены данные ПЦР о локализации *C. trachomatis* как в урогенитальном тракте взрослых мышей, так и в других органах (легкие, печень, селезенка) и тканях организма. Показано, что в морфогенезе штамма возбудителя при персистентной инфекции на фоне отсутствия клинических признаков и снижения титра возбудителя (менее $10^3$ВОЕ/мл) наблюдаются отклонения от нормального жизненного цикла с преимущественным накоплением аберрантных РТ и мелких «миниатюрных» частиц *C. trachomatis*. Ультрамалые внеклеточные формы формируются по механизму «внутренней эндоспоруляции» и могут являться ультраструктурным маркером становления персистентной формы инфекции.

**Ключевые слова:** *C. trachomatis*, персистентная инфекция, мыши Balb/c, электронная микроскопия.

**Введение.** Заболевания инфекционного генеза относятся к приоритетным направлениям исследований современной медицины. В последние десятилетия пристальное внимание со стороны различных исследователей уделяется хламидийной инфекции, что в значительной мере обусловлено уникальными биологическими свойствами возбудителя *C. trachomatis* — облигатный внутриклеточный паразитизм, существование как внутри- и внеклеточных морфотипов возбудителя в виде ре-

тикулярных телец (РТ) и элементарных частиц (ЭЧ), способность к L-подобной трансформации и т. д. [1, 2].

Известно, что хламидии поражают не только урогенитальный тракт, но и костно-суставную, сердечно-сосудистую, дыхательную, нервную систему, а также обладают способностью модифицировать иммунный ответ организма и подавлять его защитные механизмы [1]. Формирование и развитие очага поражения в организме зависит от путей инфицирования, мест локализации первичного очага инфекции, а также определяется существующими биологическими различиями циркулирующих штаммов *C. trachomatis* — их вирулентных и иммуногенных характеристик [1].

Для изучения последовательных процессов, определяющих механизмы течения хламидийной инфекции традиционно используются методы, основанные на экспериментальном инфицировании чувствительных культур клеток [3]. Были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности формирования аберрантных и дефектных морфотипов частиц *C. trachomatis*, включая L-подобных форм возбудителя in vitro под влиянием различных экзогенных и эндогенных факторов (ИФН-γ, ФНО-α, цитокины, агенты инфекционной природы, антибактериальные препараты) [3]. Вместе с тем, ультраструктурные аспекты взаимодействия возбудителя с клетками-мишенями в условиях экспериментального инфицирования животных в литературе освещены недостаточно полно. В работах зарубежных исследователей [4] показано, что степень инвазивности *C. trachomatis* по отношению к различным клеткам организма (фибробласты, эпителиоидные клетки, клетки микро- и нейроглии, синовиоциты и т. д.) зависит от характера расположения определенных аминокислот в олигосахаридах, связанных с главным белком наружной мембраны возбудителя. С использованием штаммов *Ch. pneumoniae*, *Ch. psitacci*, *C. trachomatis* Одинак М.М. с соавтр. [5] установили, что вне зависимости от вариантов заражения лабораторных мышей различные виды хламидий сохраняют преимущественную тропность к клеткам сосудистой стенки и капилляров, эндотелиоцитам, фибробластам. При морфологическом исследовании авторы описали для этих типов клеток признаки функционального напряжения их органелл, в виде вакуолизации митохондрий, появление лизосом различной плотности и размеров, апоптотически измененных ядер, выявление мелких осьмиофильных частиц, схожих с ЭЧ, а также обнаружение измененных по морфологии промежуточных телец (ПТ) и РТ хламидий. Тем не менее, в отношении *C. trachomatis* подобные сведения в литературе по-прежнему освещены лишь фрагментарно в виде отдельных наблюдений, не систематизированы и остаются спорными. Противоречивость имеющихся в литературе данных о морфологической основе патогенеза во многом обусловлена тем, что до настоящего времени полностью не разработана модель хламидийной инфекции на лабораторных животных с использованием штаммов *C. trachomatis*, патогенных для человека. Каковы особенности морфогенеза возбудителя в условиях микроокружения различных клеток-мишеней и возможного действия внутренних (эндогенных) факторов организма остаются неизученными. Ультраструктурные корреляты персистенции *C. trachomatis* при экспериментальном инфицировании лабораторных животных могут помочь ответить на многие из поставленных вопросов.

**Цель** работы: охарактеризовать ультраструктурные маркеры становления персистентной формой хламидийной инфекции в условиях экспериментального инфицирования мышей линии Balb/c штаммом *C. trachomatis* (серовар D).

**Материалы и методы.** Исследования проводились на 45 линейных мышах Balb/c 5–6 недельного возраста массой 20–25 г. Для проведения эксперимента были сформированы 2 группы животных: I группа — контрольная (15 мышей), которой вводили интактную культуру клеток McCoy; II группа — опытная (30 мышей). В работе использовали штамм *C. trachomatis* MT-2A (серовар D), депонент НКВ-№Х3-3 (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Животные опытной группы заражали путем внутривагинального введения очищенной взвесью возбудителя с титром $10^3$–$10^4$ВОЕ/мл (ВОЕ/мл — включения образующие единицы в 1 мл). Объем вводимой дозы инокулята определялся из расчета 1 мкл на 1 г массы тела животного.

Прижизненные исследования лабораторных животных включали ежедневный контроль за поведением мышей, их внешним видом, выживаемостью и т.д.

В течение первых 35 дней после начала опыта каждые 7 дней из контрольной группы отбирали по 2 самки и 4 самки из опытной группы. Всего материал отобран у 8 животных I группы и 20 животных II группы. Мышей выводили из опыта передозировкой наркоза в соответствии с этическими правилами работы с лабораторными животными [6]. Для микробиологического исследования заби-

рались смывы вагинального содержимого, кровь, биоптаты различных органов матка с ее содержимым, печень, легкие, селезенка и т. д.

В работе были использованы гистологический, электронно-микроскопический методы исследования, ПЦР. Развитие острой инфекции у животных контролировали по наличию тканецитопатического эффекта (ТЦД) в культуре клеток McCoy после внесения вагинальных смывов в культуру и при анализе гистологических срезов. Обнаружение ДНК C. trachomatis проводили в биоптатах различных органов опытных животных. Для проведения электронной микроскопии фиксацию фрагментов органов осуществляли в 2,5% глутаральдегиде, приготовленном на 0,2 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) и далее обрабатывали образцы по стандартным протоколам и методам исследования. Серийные ультратонкие срезы получали на ультратоме Ultracut E (Reichert, Австрия) и исследовали на микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при различных увеличениях: x10 000–x80 000.

**Результаты и их обсуждение.** Острая инфекция. У мышей Balb/c после внутривагинального введения штамма *C. trachomatis* (серовар D) на 2-8 сутки отмечались признаки, характерные для развития острой формы инфекции: летаргия, взъерошенность и выпадение шерсти, снижение двигательной активности. Однако результаты гистологического анализа показали, что в течение первых 7 дней после инфицирования и до 21 дня после заражения морфология исследуемых органов (матка, легкие, печень и т. д.) самок мышей опытной и контрольной группы заметно не отличалась. Тем не менее, в период 24 и более сут обнаруживались признаки воспалительной инфильтрации в виде сегментоядерных лейкоцитов в шейке и стенке матки на фоне примеси к инфильтрату эозинофильных лейкоцитов. В плоском эпителии шейки матки в период до 28 дней от момента заражения преимущественно отмечались крупные округлые клетки с мелкозернистой цитоплазмой. При анализе смывов вагинального содержимого возбудитель выделялся как в культуре клеток, так и обнаруживался ПЦР-методом. Таким образом, полученные данные свидетельствовали о развитии острого воспалительного процесса в репродуктивном тракте опытных животных.

***Персистентная инфекция.*** Спустя 28 дней после инфицирования острая клиническая симптоматика у животных становилась менее выраженной на фоне снижения титра возбудителя до $10^2$ВОЕ/мл. Однако при гистологическом исследовании образцов органов опытных мышей были обнаружены множественные мелкие околоядерные включения, содержащие *C. trachomatis*. Кроме того, результаты ПЦР позволили выявить специфический фрагмент ДНК возбудителя в паренхиматозных органах (в легком — 58% случаев; печень — 41,7%) экспериментальных самок мышей [7].

Ультраструктурные исследования образцов органного материала подтвердили результаты гистологии и позволили констатировать становление персистентной формы инфекции на морфологическом уровне. Наиболее выраженные признаки патологии отмечены в ткани легкого и печени. В альвеолоцитах легочной ткани обнаруживались округлые ядра с разрыхленной кариолеммой, хроматин сохранял мелкогранулярную структуру и неравномерно концентрировался вдоль ядерной мембраны. Ядра некоторых альвеолоцитов были изменены по типу апоптоза. Цитоплазма альвеолоцитов в перинуклеарной зоне содержала небольшое количество органелл, среди которых отмечались деструктивно измененные митохондрии с вакуолизированными кристами и разрушенными наружными мембранами.

В ткани печени основные патологические изменения затрагивали, как правило, гепатоциты, ретикулоэндотелиоциты и эндотелиальные клетки. В клетках эндотелия кровеносных сосудов отмечалась неравномерная выраженность ядер, повреждение эндоплазматической сети и аппарата Гольджи. В ряде случаев отмечались клетки со сморщенным ядром и сильно конденсированным хроматином или лишенные оформленного ядра с распадом цитоплазмы на отдельные «глыбки», что указывало о некротических поражениях.

Результаты ультраструктурного анализа органного материала мышей Balb/c, инфицированных штаммом *C. trachomatis*, суммированы в таблице.

Таблица — Ультраструктурные изменения в клеточных органеллах биоптатов органов мышей Balb/c с экспериментальной хламидийной инфекцией

| ОРГАННЫЙ МАТЕРИАЛ | | | |
|---|---|---|---|
| **Матка с ее содержимым** | **Легкие** | **Печень** | **Селезенка** |
| **Секреторные, реснитчатые клетки**<br>1. Количество микроворсинок и ресничек на поверхности уменьшено, клетки рыхло прилегают друг к другу и имеют не четкие границы.<br>2. Глыбки хроматина неравномерно распределены по нуклеоплазме с конденсацией его преимущественно у кариолеммы.<br>3. Цитоплазма повышенной электронной плотности:<br>– нечеткая выраженность контуров внутриклеточных органелл;<br>– расширение профилей канальцев эндоплазматической сети с уменьшением числа рибосом.<br>В апикальной части клеток различаются митохондрии с просветленным матриксом и разрушенными кристами | **Альвеолоциты**<br>1. Округлые или овальные ядра с разрыхленной кариолеммой и разреженным, диффузным хроматином.<br>2. Уменьшение количества органелл в цитоплазме и перинуклеарной зоне:<br>– набухание митохондрий, их деструкция и укорочение крист;<br>– гранулярный эндоплазматический ретикулум в виде единичных мембран, на поверхности которых отдельные рибосомоподобные гранулы;<br>– наличие осьмиофильных включений, представленных лизосомоподобными структурами и фагосомами, с остатками фагоцитированного материала | **Гепатоциты**<br>1. Овальные ядра с диффузным хроматином, кариолемма и ядерные поры расширены, в отдельных ядрах — явления кариопикноза и кариолизиса.<br>2. Деструктивные процессы цитоплазмы:<br>– уменьшение количества митохондрий и их вакуолизация, контуры мембраны и крист слабо просматриваются;<br>- гранулярный эндоплазматический ретикулум дегранулирован, рибосомальные гранулы на его поверхности практически не различимы<br>– увеличение количества лизосом различной электронной плотности;<br>– уменьшение количества гранул гликогена | **Лимфоциты, лимфобласты, плазмоциты, макрофаги**<br>1. Уменьшение количества лимфоцитов и лимфобластов.<br>2. Плазмоциты имеют зернистую эндоплазматическую сеть с размытым контуром мембран и значительным количеством электронноплотных телец внутри «цистерн».<br>3. В цитоплазме макрофагальных клеток множество фагосом с фрагментами фагоцитированного материала, остатками лизосом и гетеролизосом |

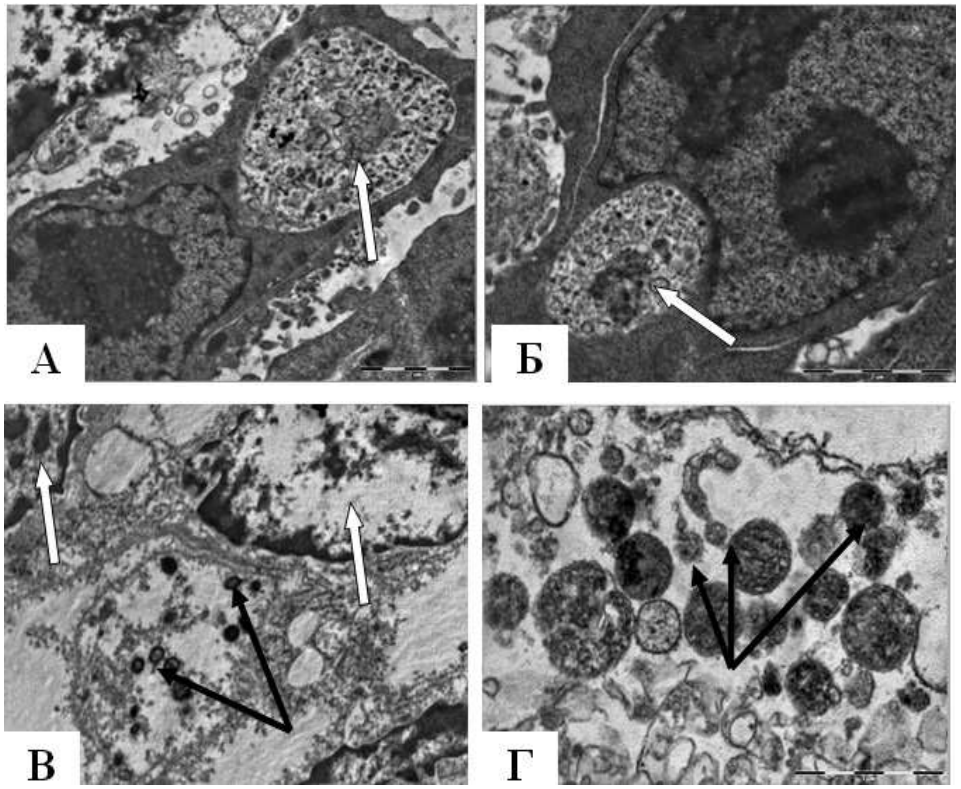
При электронно-микроскопическом исследовании удалось подтвердить наличие этиологического агента — *C. trachomatis* в эпителии маточных труб, альвеолоцитах легочной ткани и гепатоцитах печени опытных мышей. В цитоплазме реснитчатых клеток эпителия маточных труб наблюдали преимущественно два типа включений. Первый тип — включения типичной округлой формы диаметром 0,4±0,05 мкм, занимающие основную часть цитоплазмы, но неплотно заполненные возбудителем, что характерно для морфогенеза большинства штаммов *C. trachomatis*. Второй тип – множественные мелкие ламеллярные включения овальной или пузыревидной формы диаметром 0,35±0,04 мкм, не равномерно заполненные возбудителем. Большинство из инфицированных клеток находилось в разрушенном состоянии, их цитоплазма становилась дисперсной — во внеклеточном пространстве отмечались мелкие осьмиофильные электронно-плотные частицы 0,15–0,2 мкм, а также тельца более крупного размера (0,6–0,8 мкм), но также с размытым контуром клеточной стенки. Все эти частицы на ультраструктурном уровне соответствовали L-формам ЭЧ и аберрантным морфовариантам РТ *C. trachomatis*.

В межклеточном пространстве десквамированных альвеолоцитов и гепатоцитов отмечались весьма необычные мелкие шаровидные «миниатюрные» образования, в виде одиночных или многочисленных пузырьков (везикул). По морфологическим особенностям данные частицы не превышали величины 0,08–0,12 мкм. Кроме того, большинство из этих частиц имели сильно истонченную клеточную стенку и не структурированный протопласт с едва сохранившимися внутри него островками цитоплазмы, но среди них в 5–10% случаев различались формы с более целостным протопластом, который был заполнен гранулированной осьмиофильной массой, напоминающей скопления рибосом. Снаружи клеточная оболочка только лишь частично присутствовала, в некоторых случаях на ее поверхности обнаруживались элементы мембранноподобных структур.

Таким образом, результаты электронно-микроскопических исследований суммированы на рисунке.

В работе Phillips D. et al [8] с использованием биовара *C. trachomatis* MoPn (мышиная пневмония) было показано, что внутривагинальное введение лабораторным животным возбудителя приводит к восходящей урогенитальной инфекции. В морфогенезе исследуемого биовара помимо типичных морфотипов частиц (ЭТ, ПТ, РТ) были обнаружены ультрамалые формы возбудителя, которые авторы отнесли к «миниатюрным» РТ. Основываясь на данных о том, что эти формы возбудителя не могли быть образованы в условиях действия антибиотиков или иных иммуносупрессирующих факторов авторы предположили, что накопление подобных частиц является либо следствием реакции самого организма хозяина в ответ на введение внутриклеточного патогена, либо сами эти части-

цы представляют не реплицирующиеся, но потенциально инфекционные формы хламидий, которые играют определенную роль в поддержании персистентной инфекции внутри организма-хозяина. Ранее нами [9] было установлено, что при воспроизведении хламидийной инфекции в культуре клеток на поздних этапах морфогенеза возбудителя во внеклеточном пространстве обнаруживаются весьма мелкие необычной морфологии частицы, сходные с ультрамалыми формами *C. trachomatis*.




А, Б — Мелкие внутрицитоплазматические ламеллярные включения («микроколонии») в реснитчатых клетках маточных труб, содержащих возбудитель *C. trachomatis*. Внутри включения хорошо заметны шаровидные («глобулоподобные») структуры умеренной и повышенной электронной плотности. Ядро инфицированной клетки слегка смещено к периферии и имеет неровные контуры Ув. х 30 000;
В — Деструктивно измененные, десквамированные альвеолоциты и скопления мелких осмиофильных частиц, соответствующих ЭЧ в просвете капилляра легочной ткани Ув. х 30 000;
Г — морфогенез различных аберрантных морфотипов *C. trachomatis*. Среди них хорошо заметны мелкие плеоморфные формы возбудителя диаметром 0,09–0,1 мкм повышенной электронной плотности, соответствующие «миниатюрным» формам *C. trachomatis.* Ув. х 40 000
Рисунок — Особенности морфогенеза штамма *C. trachomatis* (серовар D) в условиях экспериментального инфицирования лабораторных мышей линии Balb/c

В представленной работе для моделирования хламидийной инфекции был выбран штамм *C. trachomatis* (серовар D), который был ранее выделен от пациента с урогенитальной патологией. С использованием экспериментальной животной модели нами показано, что при внутривагинальном инфицировании “человеческим” штаммом возбудителя происходит генерализация инфекции из урогенитального тракта взрослых животных в другие органы и ткани организма. Патологические процессы, наблюдаемые в исследовавшемся органном материале, являются, по-видимому, необратимыми в связи с деструкцией специализированных и жизненно-важных клеточных органелл, являющихся структурными элементами микроокружения различных клеток мишеней. Описанные «ультрамикроформы» частиц *C. trachomatis* и комплекс выявленных патологических изменений в описанных органах и тканях являются адекватными маркерами, указывающими о возможности хронизации хламидийной инфекции с переходом ее в персистентную форму.

Таким образом, мы расширили понимание явления персистенции и показали, что во внеклеточном пространстве, наряду с абберантными морфовариантами РТ формируются мелкие частицы возбудителя, т. е. персистенция сопровождается своеобразной «внутренней эндоспоруляцией» частиц *C. trachomatis*.

**Выводы.** Внутривагинальное инфицирование мышей линии Balb/c штаммом *C. trachomatis* (серовар D) приводит к восходящей инфекции урогенитального тракта и других органов взрослых животных. Метод серийных ультратонких срезов позволяет точно подтвердить внутриклеточную локализацию возбудителя в образцах паренхиматозных органов и оценить характер оказываемых возбудителем поражений клеточных органелл в условиях микроокружения различных клеток-мишеней. Комплекс выявленных патологических процессов в организме мышей Balb/c можно считать патогномоничными. Для исследованного штамма персистенция коррелирует с накоплением двух морфотипов РТ и дополнительным появлением во внеклеточном пространстве мелких «миниатюрных» частиц, вероятно отражающих уникальный биологический феномен — своеобразной «внутренней эндоспоруляции».

**Литература**


1. Батыршина, С.В. Урогенитальный хламидиоз: проблемы, возможности и перспективы диагностики, терапии и профилактики / С.В. Батыршина // Практ. медицина. — 2010. — № 2. — С. 73–80.
2. AbdelRahman, Y. The chlamydial developmental cycle / Y. AbdelRahman, R. Belland // FEMS Microbiol. Rev. — 2005. — Vol. 29. — P. 949–959.
3. Hogan, R.J. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm / R.J. Hogan, S.A. Mathews // Infect. Immun. — 2004. — Vol. 4. — P. 1843–1855.
4. An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells / C. Kuo [et al.] // J. Clin. Invest. — 1996. — Vol. 98. — P. 2813–2818.
5. Патология нервной системы при экспериментальной хламидийной инфекции / М. М. Одинак [и др.] // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. — 2006. — № 1. — С. 42–48.
6. Об утверждении Ветеринарно-санитарных правил по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в виварриях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках: Постановление М-ва сельск. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, 21 мая 2010 г., № 36 // Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь. — 2010.
7. Ермоченко, В.А. Репродуктивная функция мышей линии Balb/c при интравагинальном инфицировании *Chlamydia trachomatis* / В.А. Ермоченко [и др.] // Новости мед.-биолог. наук. — 2011. — Т. 3, № 1. — С. 52–56.
8. Phillips, D.M. Ultrastructure of Chlamydia trachomatis infection of the mouse oviduct / D.M. Philips, C.E. Swenson, J. Schachter // J. Ultrastruct. Res. — 1984. — Vol. 88. — P. 244–256.
9. Полиморфизм внеклеточных форм элементарных частиц *Chlamydia trachomatis*: ультраструктурная и наноскопическая характеристика / А.Н. Асташонок [и др.] // Известия Нац. Академии Наук Беларуси. Серия биолог. наук. — 2012. — № 4. — С. 76–82.


## ULTRASTRUCTURAL CORRELATES OF THE PERSISTENT CHLAMYDIAL INFECTION BY EXPERIMENTAL INFECTION MICE BALB / C WITH USING STRAIN *C. TRACHOMATIS* (SEROVAR D)


**Astashonok A.N., Rubanik L.V., Poleshchuk N.N.**

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



Modeling of the chlamydial infection by intravaginal inoculation Balb/c mice using strain *C. trachomatis* (serovar D) were conducted and ultrastructural aspects of the developmental infection events were studied. Electron microscopy confirmed by the data of PCR the localization of *C. trachomatis* not only in the urogenital tract of adult mice but also in other organs (lungs, liver, spleen) and tissues. It is shown that in morphogenesis of the causative pathogen strain against a background of absence of the clinical signs and reducing the infectious titer (less then $10^3$IFU/ml) there exist deviations from the normal life cycle *C. trachomatis* with preferential accumulation the aberrant RB and ultrasmall "miniature" particles of the pathogen. Ultrasmall extracellular forms are generated by the mechanism of "internal endosporulation" and can be ultrastructural marker of the persistent chlamydial infection *in vivo*.



**Keywords:** *C. trachomatis*, persistent infection, mice Balb/c., electron microscopy

Поступила 02.09.2013

# ПАТОЛОГИЯ СЕРДЦА, ВЫЯВЛЕННАЯ НА ФОНЕ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ

**Батян Г.М.[1], Булдык Е.А.[2], Стрижак Ю.В.[2]**

*[1]Белорусский государственный медицинский университет;*

*[2]Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Проведено изучение патологии сердца, развившейся у пациентов Городской детской инфекционной клинической больницы г. Минска, госпитализированных в период 2003–2011 гг. Выявлено, что 65% респираторных заболеваний, на фоне которых возникали изменения со стороны сердца, имели вирусную природу и 35% — бактериальную. Наиболее частым проявлением сердечной патологии были инфекционно-токсическая миокардиодистрофия и перикардит. Представлены клинические, ультразвуковые и электрокардиографические признаки поражения сердца, а также варианты клинического течения в зависимости от тяжести основного заболевания и наличия сопутствующей патологии.

**Ключевые слова:** острая респираторная инфекция, инфекционно-токсическая миокардиодистрофия, миокардит, дети.

**Введение.** Изменения со стороны сердца, выявленные в остром периоде инфекционных заболеваний, нередко вызывают затруднения в плане правильной трактовки и ведения данной патологии. Появление тахи- и брадиаритмии, приглушенности сердечных тонов, систолического шума и других сердечных симптомов требует проведения обследования для уточнения характера и причины данных изменений.

**Целью** исследования явилось определение структуры сердечной патологии у детей с изменениями со стороны сердца на фоне основного заболевания.

Материалом для исследования послужили 68 историй болезни пациентов, находившихся на лечении в Городской детской инфекционной клинической больнице г. Минска в период с 2003 по 2011 гг., и 1417 заключений ультразвукового исследования (УЗИ) сердца. Возраст пациентов исследуемой группы составил от 1 месяца до 18 лет, мальчиков было 65%, девочек — 35%. Более 50% составили дети первых 3-х лет жизни.

Был использован метод ретроспективного анализа. Для диагностики сердечной патологии проводились УЗИ сердца, ЭКГ, биохимический анализ крови (СРБ, серомукоид, РФ, АСЛО, АСТ, КФК, КК-МВ, ЛДГ), для уточнения этологического фактора были использованы методы ИФА и ПЦР диагностики.

**Результаты и их обсуждение.** Выявлено, что большая часть инфекционных заболеваний, на фоне которых возникали изменения со стороны сердца, имели вирусную природу (ОРВИ неуточненной этиологии — 30,35%, энтеровирусная инфекция — 14,31%, аденовирусная инфекция — 3,07%, РС-вирусная — 3,07%, вирус Эпштейна-Барр — 3,07%, герпетическая инфекция — 6,15%, вирус гриппа — 1,54%). Бактериальная этиология имела место в 34,85% случаев (стафилококк, стрептококк, гемофильная палочка).

На 7–9-е сут болезни у пациентов с вирусной инфекцией и на 10–14-е сут у детей с заболеваниями бактериальной природы, помимо общих проявлений (лихорадка, кашель, боль в горле), выраженность которых стала угасать, обратило на себя внимание появление тахи- и брадикардии (61,5%), болей в грудной клетке у старших детей (12,3%), приглушенности сердечных тонов (10,76%), аритмии (9,2%), что заставило провести УЗИ сердца и ЭКГ. На ЭКГ были выявлены следующие изменения: брадикардия — 7,69%, тахикардия — 42,31%, снижение сегмента ST, отрицательный зубец T — 30,76%, гипертрофия и перегрузка левых отделов сердца — 28,85%, гипертрофия и перегрузка правых отделов сердца — 13,46%, единично — экстрасистолии, медленный предсердный эктопический ритм, атрио-вентрикулярная блокада I степени, блокада правой ножки пучка Гиса, удлинение интервала QT, что подтвердило вовлечение в процесс миокарда. Данные изменения в большинстве случаев расценивались как инфекционно-токсическая миокардиодистрофия.

На УЗИ сердца определялись признаки перикардита с экссудатом в полости перикарда и сепарация листков перикарда от 2,6 до 8 мм. Ведущим признаком, сопровождающим перикардит на фоне энтеровирусной инфекции у детей раннего возраста, была брадикардия. У 20,65% пациентов

купирование симптомов перикардита произошло без дополнительного назначения медикаментозной терапии; 32,35% больных получали глюкокортикостероиды и диуретики в связи с тяжестью заболевания, большим количеством жидкости в перикарде, воспалительными изменениями в общем и биохимическом анализах крови; 47% получали нестероидные противовоспалительные средства; 80% больных получали неспецифическую кардиотрофную терапию (милдронат, аспаркам); одному пациенту с ОРИ, имевшему врожденный порок сердца (ВПС), в связи тяжелым течением перикардита и угрозой тампонады сердца потребовалась пункция перикарда. Длительность заболевания составила 7–12 дней, что было зарегистрировано контрольным УЗИ сердца, положительной динамикой на ЭКГ и в общем анализе крови. Отрицательная динамика наблюдалась у пациента с сепсисом, туберкулёзом, инфекционным эндокардитом, у ребенка с перинатальной патологией ЦНС и у пациента с тяжелым миоперикардитом.

При анализе заключений УЗИ сердца детей с впервые выявленным систолическим шумом были получены следующие результаты. Малые аномалии развития сердца (МАРС) имели 75,6% обследованных. Чаще всего встречались дополнительная хорда левого желудочка — 37,8%, в т. ч. в сочетании с другими МАРС — 24,06%, в сочетании с ВПС — 3,37%, изолировано — 72,57%. Пролапс митрального клапана различной степени встречался у 6,9% обследованных: I ст. составила 83,67%, II ст. — 16,33%. Открытое овальное окно наблюдалось в 27,1% случаев, из них изолировано в 67,1% случаев, в сочетании с другими МАРС — 27,6%, с ВПС — 5,3%. ВПС встречались у 10,17% обследованных. Дефект межпредсердной перегородки составил 44,14% от всех ВПС и наблюдался изолировано в 50% случаев, в сочетании с МАРС — в 15,7%, в сочетании с другим ВПС — в 34,3%. Дефект межжелудочковой перегородки составлял 25,52% от всех ВПС и встречался как изолировано в 48,65% случаев, так и в сочетании с МАРС (2,72%) и с другими ВПС (48,63%). На долю открытого аортального протока пришлось 20,7% от всех ВПС, включая 33,33% случаев изолированного выявления, 50% — в сочетании с МАРС и 16,67% — в сочетании с другими ВПС. Другие ВПС (тетрада Фалло, коарктация аорты) составили 9,64% от всех ВПС. Структурные изменения клапанов были обнаружены у 0,5% обследованных (6 случаев). Среди них наблюдались поражение створок аортального и митрального клапанов в виде краевого фиброза клапанов (1 случай), утолщения створок клапанов (2 случая), миксоматозной дегенерации (1 случай), сочетания краевого фиброза и утолщения створок клапанов (2 случая).

**Выводы:**

1. Наиболее частым проявлением сердечной патологии на фоне инфекционных заболеваний были инфекционно-токсическая миокардиодистрофия и перикардит.

2. Перикардиты у большинства пациентов имели доброкачественный характер, легкое и среднетяжелое течение с купированием признаков экссудата в перикарде в среднем за одну неделю (по данным УЗИ сердца), что не требует лечения в специализированном стационаре и длительного амбулаторного наблюдения таких лиц.

3. Тяжелое течение перикардита имело место у детей с сопутствующей патологией (ВПС, поражение ЦНС), либо было обусловлено основным заболеванием (сепсис, пневмония), в связи с чем была назначена адекватная терапия.

4. Доминирующей причиной впервые выявленного систолического шума явились малые аномалии развития сердца, которые наблюдались в 75,6% случаев. ВПС были обнаружены у 10,17% обследованных.

5. Причинами краевого фиброза створок клапанов могли быть перенесенный или латентно текущий ревматический процесс, что требует обследования и лечения данных пациентов в условиях специализированного кардиоревматологического стационара.

**Литература**

1. Шарыкин, А.С. Врожденные пороки сердца / А.С. Шарыкин. — СПб.: Бином, 2009. — 392 с.
2. Мутафьян, О.А. Детская кардиология / О.А. Мутафьян. — СПб.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 504 с.

## HEART ABNORMALITIES REVEALED DURING THE COURSE OF ACUTE RESPIRATORY DISEASES IN CHIDREN

**Batyan G.M.[1], Buldyk E.A.[2], Strizhak Yu.V.[2]**

*[1]Belarus State Medical University;*

*[2]Minsk City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital, Minsk, Belarus*

The structure of the heart abnormalities developed during the course of acute infectious diseases in patients of Minsk City Children's Infectious Diseases Hospital, in the period 2003–2011, was investigated. In total 65% of infectious diseases, which were followed by the heart abnormalities, had a viral nature, and 35% — bacterial nature. The most common manifestations of cardiac abnormalities were toxic infectious myocardiodystrophy and pericarditis. Clinical, ultrasound and electrocardiographic findings are presented, as well as a clinical course depending on severity of underlying disease or concomitant illness.

**Keywords:** acute respiratory infection, toxic infectious myocardiodystrophy, pericarditis, children.

Поступила 06.09.2013

## ПАРАМЕТРЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ИНФЕКЦИЯХ

**Вершинина С.И., Петренко Т.С., Сачилович Д.С.**

*Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь*

**Резюме.** У пациентов с хронической рецидивирующей герпетической инфекцией и хроническим рецидивирующим фурункулезом, обследованных в стадии ремиссии заболевания, содержание конечных продуктов липопероксидации фосфолипидов превышает значения здоровых лиц и максимально выражены при рецидивирующей герпетической инфекции, что проявляется, помимо увеличения содержания конечных продуктов фосфолипидов, повышением уровня промежуточных продуктов окисления нейтральных липидов и фосфолипидов эритроцитов крови.

**Ключевые слова:** герпес, фурункулез, хронические рецидивирующие инфекции.

Хронические рецидивирующие инфекции продолжают оставаться одной из главных причин заболеваемости во всем мире, и остаются одной из наиболее актуальных медицинских проблем современного общества. Несмотря на успехи, достигнутые в лечении и профилактике инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии, увеличивается число тяжелых форм, а также форм с торпидным течением воспалительного процесса, частыми рецидивами и малой эффективностью от адекватной этиотропной и патогенетической терапии. В настоящее время практически не вызывает сомнения тот факт, что повышенная частота острых воспалительных заболеваний и наличие хронических воспалительных процессов в организме обусловлены нарушениями адаптационных реакций организма. Одним из процессов, играющих важную роль в обеспечении компенсаторно-адаптационных реакций организма, является система перекисного окисления липидов (ПОЛ). Активация ПОЛ является универсальной реакцией на различные изменения в тканях и клетках. Эта система имеет особое значение для зрелых эритроцитов, лишенных аппарата синтеза белка и поэтому практически не способных к репаративным процессам. Избыточная активация процессов ПОЛ приводит к необратимому повреждению мембранных структур эритроцита, нарушению их проницаемости и вносит свой вклад в нарушение резистентности организма.

**Целью** данной работы является анализ параметров липопероксидации в эритроцитах у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями различной этиологии в период клинической ремиссии.

Нами было обследовано 43 пациента в возрасте от 20 до 50 лет с хроническими рецидивирующими инфекциями, из них 29 пациентов с рецидивирующей герпетической инфекцией (РГИ), 14 — с хроническим рецидивирующим фурункулезом (ХРФ). Продолжительность заболевания варьировала от 1 до 20 лет. Контрольную группу составили 36 практически здоровых лиц.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили эритроциты гепаринизированной венозной крови. Для подготовки эритроцитов к исследованию отбирали 1 мл суспензии эритроцитов, затем производили их трехкратное отмывание изотоническим раствором хлорида натрия при центрифугировании в течение 10 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Анализ параметров липопероксидации проводили до назначения медикаментозной терапии в гептан-изопропанольных экстрактах эритроцитов по методике И.А. Волчегорского. Спектрофотометрически определяли содержание первичных (диеновые конъюгаты - ДК), промежуточных (сопряженные триены — СТ) и конечных (основания Шиффа — ОШ) продуктов ПОЛ, которое рассчитывали по отношению Е232/Е220 (ДК), Е278/Е220 (СТ), Е400/Е220 (ОШ); результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.). Необходимость использования 2-х фаз вызвана особенностями экстрагирования: в гептан экстрагируются в основном нейтральные липиды, а в изопропанол — фосфолипиды, которые являются важнейшими субстратами ПОЛ.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ «Statistica 6.0».

**Результаты и их обсуждение.** У пациентов с РГИ и ХРФ в период ремиссии заболевания наблюдалось значимое увеличение содержания конечных продуктов (ОШ) окисления фосфолипидов эритроцитов ($p<0,0001$; $p=0,003$ соответственно). У пациентов с РГИ дополнительно отмечалось достоверное повышение содержания в эритроцитах промежуточных (СТ) продуктов липопероксидации нейтральных липидов ($p=0,009$) и фосфолипидов ($p=0,001$), тогда как у пациентов с ХРФ данные показатели не изменялись.

Во всех анализируемых группах концентрация первичных продуктов окисления нейтральных липидов и фосфолипидов эритроцитов периферической крови, а также конечных продуктов пероксидации нейтральных липидов эритроцитов не отличалась от контрольной группы. При сравнении групп пациентов между собой достоверных отличий ни по одному из параметров не регистрировалось.

Возможно, обнаруженные нами признаки активации свободнорадикального окисления мембран эритроцитов, проявляющиеся в максимальной степени в повышенном содержании ОШ, связаны с большей подверженностью фосфолипидов мембран эритроцитов процессам пероксидации по сравнению с нейтральными липидами.

**Выводы.** Таким образом, у пациентов с хронической рецидивирующей герпетической инфекцией и хроническим рецидивирующим фурункулезом, обследованных в стадии ремиссии заболевания, содержание конечных продуктов липопероксидации фосфолипидов превышает значения здоровых лиц и максимально выражены при рецидивирующей герпетической инфекции, что проявляется, помимо увеличения содержания конечных продуктов фосфолипидов, повышением уровня промежуточных продуктов окисления нейтральных липидов и фосфолипидов эритроцитов крови.

Исследование особенностей перекисного окисления липидов мембран эритроцитов на различных этапах развития инфекционного процесса может использоваться как тест для оценки неспецифической реактивности организма в качестве критерия мониторинга, а также планирования диагностических и терапевтических мероприятий.

## PARAMETERS OF LIPID PEROXIDATION OF RED BLOOD CELLS IN CHRONIC RECURRENT INFECTIONS

**Vershinina S.I., Petrenko T.S., Sachilovich D.S.**

*Gomel State Medical University, Gomel, Belarus*

In patients with chronic recurrent herpetic infection and chronic recurrent furunkulosis, surveyed in remission stage of disease, the end products of lipid peroxidation of phospholipids is greater than the value of healthy people and the most pronounced when recurrent Herpes infections, in addition to increasing the content of end products of phospholipids, increased levels of intermediate products of oxidation of neutral lipids and phospholipids of red blood cells.

**Keywords:** herpes, furunculosis, chronic recurrent infections.

Поступила 04.09.2013

# ПСИХОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВНУТРЕННЕЙ КАРТИНЫ БОЛЕЗНИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

**Волкова Л.В., Кроткова Е.Н.**

*Гродненская областная инфекционная клиническая больница, Гродно, Беларусь*

**Резюме.** У пациентов с хроническим вирусным гепатитом С преобладают типы отношения к болезни, характеризующиеся минимальной выраженностью дезадаптации человека в социуме в связи с заболеванием. Эргопатический способ реагирования позволяет избежать негативных изменений свойств личности.

**Ключевые слова:** психология, пациенты, хронический вирусный гепатит С.

Внутренняя картина болезни рассматривается как сочетание представлений пациента об имеющемся у него заболевании и спектра переживаний, вызванных заболеванием [1]. Она может рассматриваться как комплекс вторичных, психологических признаков заболевания, которые могут препятствовать успешности лечебных мероприятий, осложнять течение болезни. Кроме того, отношение к болезни дает представление о том, насколько нарушенной видится пациенту система его социальных отношений, т. е. выявляет наличие дезадаптации в социуме в связи с развитием и течением заболевания.

По прогнозам всемирной организации здравоохранения, в последующие 10–20 лет хронический вирусный гепатит С станет основной проблемой органов здравоохранения, так как ожидается, что в результате его распространения на 60% может увеличиться число пациентов, страдающих циррозом печени, на 68% — гепатокарциномой, на 280% — печеночной декомпенсацией и в 2 раза смертность от заболеваний печени. Лечение одного пациента с хронической формой гепатита С обходится бюджету 10–15 тыс. долларов США [2].

**Цель:** изучение многоуровневой структуры внутренней картины болезни с целью построения модели психокоррекционной поддержки пациентов с хроническим вирусным гепатитом С.

**Материалы и методы.** Обследовано 26 человек, из них 10 (38,5%) женщин и 16 (61,5%) мужчин в возрасте 21 до 70 лет. Период с момента постановки диагноза ХВГС составляет: менее 3 лет — 8 человек (30,8%), от 3 до 5 лет — 5 человек (19,2%), от 5 до 10 лет — 5 человек (19,2%), свыше 10 лет — 8 человек (30,8%).

Исследование проводилось с использованием опросника «Определение психологического типа отношения к болезни» и сокращенного многофакторного опросника личности «Мини-мульт». На основании опросника «Определение психологического типа отношения к болезни» типы отношения к заболеванию делятся на три стандартных блока, в зависимости от влияния болезни на адаптацию пациентов в социальной среде.

I блок включает в себя гармоничный (Г) тип отношения к заболеванию, характеризующийся трезвой оценкой своего состояния без склонности преувеличивать его тяжесть, но и без недооценки серьезности болезни, эргопатический (Р), при котором доминирующей чертой является подчеркнутое стремление не принимать во внимание ограничения, которые накладывает болезнь, и придерживаться прежнего образа жизни и анозогнозический (З), центральное звено этого типа — активное отбрасывание мыслей о болезни, следствием чего является легкомысленное отношение к лечению. Эти варианты отношения к болезни характеризуются минимальной выраженностью дезадаптацией человека в социуме в связи с заболеванием.

II и III блоки шкал говорят о наличии личностной дезадаптации в связи с заболеванием, при этом дезадаптация имеет разную направленность. II блок включает типы реагирования на болезнь с интрапсихической направленностью. Клинически это выражается в угнетенном эмоциональном состоянии и «уходе в болезнь». Это типы: тревожный (тип Т), ипохондрический (тип И), неврастенический (тип Н), меланхолический (тип М) и апатический (тип А). К III блоку относятся типы реагирования на болезнь с интерпсихической направленностью. В этих случаях реакции больных характеризуются дезадаптивным поведением, нарушающим межличностное взаимодействие больных с другими людьми. Это типы: сенситивный (тип С), эгоцентрический (тип Э), паранойяльный (тип П) и дисфорический (тип Д).

Статистическая обработка данных осуществлялась при помощи электронного пакета статистического анализа STATISTICA 6.

**Результаты и их обсуждение.** Ведущими типами реагирования на заболевание у обследованных пациентов с хроническим вирусным гепатитом С, являются анозогнозический и гармоничный, что объясняется особенностями протекания заболевания: длительная вирусная персистенция, частое бессимптомное течение болезни (таблица).

Таблица — Типы реагирования на болезнь у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С

| | Тип реагирования на болезнь | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Гармоничный | Эргопатический | Анозогнозический | Тревожный | Ипохондрический | Неврастенический | Меланхолический | Апатический | Сенситивный | Эгоцентрический | Паранойальный | Дисфорический |
| Кол-во человек | 9 | 4 | 11 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 |
| % | 34,6% | 15,4% | 42,3% | 7,7% | 0,0% | 7,7% | 3,8% | 0,0% | 11,5% | 0,0% | 3,8% | 3,8% |

К I блоку типов были отнесены реакции 18 человек (69,2%), ко II блоку — типы реагирования 4 человек (15,4%) и к III блоку — реакции 2 человек (7,7%). Еще у 2 человек (7,7%) исследование выявило диффузный вариант реагирования, означающий одновременное присутствие признаков более трех типов отношения к болезни.

В данной выборке обнаруживаются достоверные связи между некоторыми типами отношений к болезни. Так, например, тревожный тип положительно коррелирует с ипохондрическим ($p<0,001$), меланхолическим ($p<0,001$) сенситивным ($p<0,001$) и эгоцентрическим ($p<0,001$) типами и отрицательно с эргопатическим ($p=0,001$) и анозогнозическим ($p=0,001$).

Ипохохондрический тип положительно коррелирует с неврастеническим ($p=0,004$), меланхолическим ($p=0,006$), сенситивным ($p=0,006$), эгоцентрическим ($p<0,001$) типами.

Неврастенический тип положительно коррелирует с апатическим ($p=0,006$), сенситивным ($p=0,003$), эгоцентрическим ($p=0,002$), паранойальным ($p=0,007$), дисфорическим ($p=0,001$) типами.

Паранойяльный тип положительно коррелирует с сенситивным ($p<0,001$), эгоцентрическим ($p=0,004$), дисфорическим ($p=0,003$) типами и отрицательно с эргопатическим ($p=0,005$) типом отношения к болезни.

Установлено, что эгоцентрический и сенситивный типы присутствуют в каждой из упомянутых групп, а сами группы представлены дезадаптивными типами отношения к болезни. В связи с этим можно предположить, что чем более человек «уходит в болезнь», эмоционально сильно включается в нее, при этом спектр эмоций характеризуется переживаниями своей неполноценности и ущербности, и чем более внимание больного фиксировано на знаках, которые, по его мнению, подтверждают данное представление, тем выше личностная дезадаптация.

Стоит отметить, что не выявлено достоверной зависимости между типом отношения к болезни и такими показателями как возраст, пол и «стаж» заболевания. Логично предположить, что формирование различных нозогнозических реакций на болезнь не зависит от длительности заболевания. Однако, положительная закономерность выявляется между длительностью заболевания и появлением таких личностных свойств как ипохондрия ($p=0,004$), истерия ($p=0,025$), психопатия ($p=0,033$), психастения ($p=0,02$), шизоидность ($p=0,04$), о чем свидетельствуют результаты сокращенного многофакторного опросника личности «Мини-Мульт». Вероятно, главное в реагировании на болезнь – особенности личности больного. С увеличением «стажа» заболевания для пациентов с хроническим вирусным гепатитом С повышается эмоциональная значимость их соматических ощущений: общее самочувствие, работоспособность, наличие болевых ощущений. Появляется склонность к невротическим защитным реакциям, возрастает конфликтность. Настроение пациентов неустойчивое, они проявляют большую обидчивость, возбудимость, что в итоге может способствовать социальной дезадаптации.

**Выводы:**

1. У пациентов с хроническим вирусным гепатитом С преобладают типы отношения к болезни, характеризующиеся минимальной выраженностью дезадаптации человека в социуме в связи с заболеванием.

2. Длительность заболевания, не изменяя структуры внутренней картины болезни пациентов с хроническим вирусным гепатитом С, ведет к изменению непосредственно свойств личности.

3. Эргопатический способ реагирования позволяет избежать негативных изменений свойств личности.

**Литература**

1. Большой психологический словарь / Под ред. Б.Г. Мещерякова, В.П. Зинченко. — М., 2003 — С. 69
2. Цыркунов, В.М. HVC-инфекция / В.М. Цыркунов, И.В. Матиевская, С.П. Лукашик; под ред. В.М. Цыркунова. — Минск: Асар, 2012. — С. 3.

## THE PSYCHOLOGICAL STRUCTURE OF THE INTERNAL PICTURE OF THE DISEASE PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

**Volkova L.V., Krotkova E.N.**

*Grodno Regional Infectious Clinical Hospital, Grodno, Belarus*

In patients with chronic viral hepatitis C is dominated by types of attitude to the disease, characterized by a minimum degree of maladaptation in society due to the disease. Describes how to avoid adverse changes to the properties of the individual in patients.

**Keywords:** psychology, patients with chronic viral hepatitis C.

Поступила 04.09.2013

## БЕТА-ЛАКТАМАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИКВОРА И ЕЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

**Жильцов И.В., Семенов В.М., Зенькова С.К., Васильева М.А., Дмитраченко Т.И., Кубраков К.М.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** Наивысший уровень бета-лактамазной активности спинномозговой жидкости отмечается у пациентов с субарахноидальными кровоизлияниями, приводящими к возрастанию концентрации сывороточного альбумина в ликворе. Обсуждаются вопросы терапии.

**Ключевые слова:** бета-лактамаза, субарахноидальные кровоизлияния.

**Введение.** Устойчивость бактерий к антибиотикам бета-лактамного ряда и ингибиторам бета-лактамаз — непрерывно растущая проблема, приводящая к снижению эффективности лекарств, образующих краеугольный камень арсенала клиницистов (до 75% всех назначаемых в мире антибактериальных препаратов относятся к группе бета-лактамов) [1, 5]. Устойчивость к данным антибиотикам обусловлена, в первую очередь, продукцией микроорганизмами разнообразных бета-лактамаз. Помимо этого существуют и другие механизмы устойчивости, давно известные ученым и хорошо изученные [6]. Гораздо менее изученными остаются эндогенные факторы макроорганизма, которые могут разрушать антибиотики бета-лактамного ряда независимо от наличия резистентности у бактерий — возбудителей инфекционных заболеваний. Считается, что бета-лактамы не метаболизируются в организме и выводятся в неизмененном виде с мочой и желчью. Тем не менее, существуют немногочисленные работы, указывающие на то, что эндогенные факторы могут играть более важную роль в метаболизме бета-лактамов, чем это принято полагать [2, 3, 7]. Данное предположение открывает новые подходы к пониманию наблюдаемых в клинике феноменов. Так, при ряде инфекционных заболеваний описана клиническая неэффективность различных бета-лактамных антибиотиков, которые *in vitro* эф-фективно подавляли жизнедеятельность возбудителей соответствующих инфекций. Учитывая важность проблемы для практического здравоохранения, избранное на-

учное направление является принципиально новым, приоритетным и находится на острие научной проблематики отрасли.

С целью упрощения, ускорения и удешевления процедуры анализа эндогенной бета-лактамазной активности нами разработана тест-система «БиоЛак-там». Данная тест-система позволяет количественно оценивать уровень «суммарной» бета-лактамазной активности в биологических жидкостях (сыворотке крови, спинномозговой жидкости, моче, слюне), а также в биологических субстратах, из которых можно приготовить прозрачный фильтрат (в частности, в мокроте), независимо от факта выделения чистой культуры возбудителя заболевания из данного биологического материала.

Соответственно, **целью** настоящего исследования была оценка принципиальной возможности определения бета-лактамазной активности спинномозговой жидкости (СМЖ) при помощи тест-системы «БиоЛактам», а также анализ клинической значимости данного параметра.

**Материалы и методы.** Пробы СМЖ забирались при проведении диагностических люмбальных пункций у больных с вирусными и бактериальными менингитами, госпитализированных в Витебскую областную клиническую инфекционную больницу (ВОКИБ) в 2006–2009 гг. Всего было собрано 40 проб ликвора больных бактериальными менингитами и 65 проб ликвора больных вирусными менингитами. Кроме того, в исследование вошли 53 пробы ликвора, полученных у лиц без нейроинфекций, и 24 пробы ликвора пациентов с субарахноидальными кровоизлияниями.

В основе функционирования тест-системы «БиоЛактам» лежит методика, базирующаяся на изменении окраски синтетического антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина при распаде его бета-лактамной связи. При этом происходит батохромный сдвиг в хромофорной системе молекулы, и окраска реакционной смеси меняется с желтой на красно-оранжевую. Максимум поглощения продукта реакции при этом меняется с 390 на 486 нм, что и делает возможным спектрофотометрическую детекцию [4].

**Результаты и их обсуждение.** Средний уровень выявленной нами бета-лактамазной активности СМЖ составил 15,9% (95% ДИ: 13,3…18,4), медиана уровня активности — 9,2% (95% ДИ: 7,8…10,9). Минимальный выявленный уровень активности был равен 0, максимальный — 97,8%.

Были вычислены показатели центральной тенденции бета-лактамазной активности СМЖ в подгруппах больных, вошедших в исследуемую выборку: в подгруппе бактериальных менингитов — M=19,4 (95% ДИ: 13,6…25,1), Me=13,1 (25‰ ——4,1, 75‰ — 28,2); в подгруппе вирусных менингитов — M=14,9 (95% ДИ: 10,4… 19,4), Me=9,4 (25‰ — 6,0, 75‰ — 15,3); в подгруппе субарахноидальных кровоизлияний — M=27,2 (95% ДИ: 18,4… 35,9), Me=21,2 (25‰ — 16,5, 75‰ — 32,1); в подгруппе без признаков поражений ЦНС — M=9,0 (95% ДИ: 5,0…12,9), Me=5,7 (25‰ — 2,5, 75‰ — 8,6).

Наиболее высокий уровень бета-лактамазной активности СМЖ наблюдался у больных с субарахноидальными кровоизлияниями, наиболее низкий — у пациентов без доказанной инфекционной патологии ЦНС. Средние уровни бета-лактамазной активности СМЖ в подгруппах больных бактериальными и вирусными менингитами различались недостоверно ($p=0,31$, U-тест Манна–Уитни), различия же средних уровней бета-лактамазной активности ликвора во всех остальных подгруппах оказались статистически значимыми.

Согласно данным ROC-анализа, уровень бета-лактамазной активности СМЖ, превышающий 8,6%, указывает на наличие у пациента поражения ЦНС с чувствительностью 63,8% (95% ДИ: 55,2…71,8) и специфичностью 76,5% (95% ДИ: 62,5…87,2) при AUC=0,725 (95% ДИ: 0,655…0,787) и $p<0,0001$. Соответственно, уровень бета-лактамазной активности СМЖ, превышающий 14,3%, указывает на наличие у больного субарахноидального кровоизлияния с чувствительностью 91,7% (95% ДИ: 73,0…98,7) и специфичностью 71,7% (95% ДИ: 64,6…78,1) при AUC=0,788 (95% ДИ: 0,726…0,841) и $p<0,0001$.

Частотный анализ распределения уровней бета-лактамазной активности проб СМЖ показал, что данное распределение сильно смещено влево, т. е. большая часть проб ликвора не проявляет значимой бета-лактамазной активности. В то же время выделяется относительно небольшая группа образцов СМЖ, обладающих высокой (≥20%) бета-лактамазной активностью; количество данных случаев составляет 52 (25% от всей выборки, 95% ДИ: 19,1… 30,9).

Корреляционный анализ зависимости эффективности антибактериальной терапии, проводимой больным с бактериальными менингитами, от уровня бета-лактамазной активности проб их СМЖ, выявил следующие закономерности:

1. Прямую корреляцию средней силы между уровнем бета-лактамазной активности СМЖ и максимальным количеством одновременно назначенных пациентам антибактериальных препаратов (R=0,586, p<0,0001, n=39).

2. Прямую корреляцию между уровнем бета-лактамазной активности СМЖ и назначением пациентам бета-лактамных антибиотиков резерва — цефалоспоринов 4-го поколения либо карбапенемов (R=0,381, p=0,017, n=39).

3. Прямую корреляцию средней силы между уровнем бета-лактамазной активности СМЖ и назначением пациентам антибиотиков, не относящихся к классу бета-лактамов (R=0,533, p<0,0001, n=39).

4. Прямую корреляцию средней силы между уровнем бета-лактамазной активности СМЖ и общим количеством антибиотиков, назначенных пациентам в ходе антибактериальной терапии (R=0,522, p=0,001, n=39).

Вышеперечисленные корреляции напрямую указывают на связь повышенного уровня бета-лактамазной активности СМЖ больных с бактериальными менингитами со сниженной эффективностью проводимой этим больным антибактериальной терапии, базирующейся на использовании бета-лактамных антибиотиков первой линии.

Нами был также проведен анализ достоверности различий клинико-лабораторных показателей, характеризующих тяжесть течения заболевания и эффективность антибактериальной терапии, в подгруппах пациентов с высокой и низкой бета-лактамазной активностью СМЖ. Полученные в ходе сравнения результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Значимость различий клинико-лабораторных показателей, характеризующих эффективность антибактериальной терапии в подгруппах пациентов с высокой (≥20%) и низкой бета-лактамазной активностью СМЖ (U-тест Манна–Уитни)

| Показатель | Подгруппа 1 (бета-лактамазная активность СМЖ < 20%), n=53 M (95% ДИ) | Подгруппа 1 (бета-лактамазная активность СМЖ ≥ 20%), n=21 M (95% ДИ) | Достоверность различий, p |
|---|---|---|---|
| Средняя продолжительность антибактериальной терапии, сут | 16,5 (12,9…20,1) | 21,8 (14,2…29,3) | >0,05 |
| Средняя продолжительность госпитализации, сут | 22,7 (19,2…26,2) | 29,3 (20,0…38,7) | >0,05 |
| Максимальное количество антибиотиков, назначенных одновременно | 1,3 (1,1…1,5) | 2,0 (1,7…2,3) | 0,0015 |
| Количество смен антибактериальной терапии | 0,8 (0,5…1,2) | 1,6 (0,9…2,3) | 0,043 |
| Вероятность назначения антибиотика резерва бета-лактамного ряда, % | 22,6 (11,0…34,3) | 52,3 (29,1…75,7) | 0,047 |
| Вероятность назначения антибиотика, не являющегося бета-лактамом, % | 35,8 (22,5…49,2) | 76,2 (56,3…96,1) | 0,0066 |
| Вероятность назначения антибиотика резерва — не бета-лактама, % | 30,2 (17,4…43,0) | 57,1 (34,1…80,2) | 0,072 |
| Общее количество антибиотиков, назначенных за время лечения | 2,2 (1,7…2,8) | 4,0 (3,0…5,0) | 0,0018 |

Из материалов, представленных в таблице 1, следует, что высокая (≥20%) бета-лактамазная активность СМЖ соответствует приблизительно удвоенной вероятности неуспеха антибактери-

альной терапии гнойных менингитов, что выражается в более высокой вероятности замены первоначально назначенной схемы лечения, более частом назначении антибиотиков резерва, включая сильнодействующие бета-лактамные препараты (карбапенемы, цефалоспорины 4-го поколения) и антибиотики второй линии из других фармакологических групп (гликопептиды, оксазолидиноны, рифампицин, хлорамфеникол и т. д.), а также в большем количестве суммарно назначенных за время стационарного лечения антибиотиков и большей продолжительности госпитализации.

Для некоторых из перечисленных в таблице 1 показателей можно вычислить отношения рисков (risk ratio, RR) (таблица 2).

Таблица 2 — Значения отношения рисков (RR) для некоторых показателей, характеризующих эффективность антибактериальной терапии, проводимой пациентам с инфекционной патологией ЦНС

| Показатель | Risk Ratio | 95% ДИ |
|---|---|---|
| 2 и более смены антибактериальной терапии | 1,94 | 1,01…3,72 |
| Назначение антибиотиков резерва из группы бета-лактамов | 2,31 | 1,22…4,40 |
| Назначение антибиотиков первой линии, не относящихся к группе бета-лактамов | 2,12 | 1,38…3,27 |
| Назначение антибиотиков резерва не относящихся к группе бета-лактамов | 1,89 | 1,09…3,29 |
| За время лечения суммарно назначено 3 и более антибиотика | 1,86 | 1,16…2,98 |
| За время лечения суммарно назначено 4 и более антибиотика | 2,33 | 1,28…4,25 |
| За время лечения суммарно назначено 5 и более антибиотиков | 3,24 | 1,39…7,58 |
| За время лечения суммарно назначено 6 и более антибиотиков | 5,89 | 1,68…20,65 |

Данные, приведенные в таблице 2, полностью подтверждают сделанные нами ранее выводы: относительно высокая (более 20%) бета-лактамазная активность СМЖ достоверно увеличивает вероятность неудачи стартовой эмпирической антибактериальной терапии, проводимой пациентам с бактериальными поражениями ЦНС, в 1,8–2,3 раза. Нижний предел доверительных интервалов всех рассчитанных нами отношений рисков превышает единицу, что указывает на высокую статистическую значимость результатов вычислений.

**Выводы:**

1. Тест-система «БиоЛактам» может успешно использоваться для качественной и количественной оценки бета-лактамазной активности СМЖ;

2. Наивысший уровень бета-лактамазной активности СМЖ отмечается у пациентов с субарахноидальными кровоизлияниями, что можно объяснить существенным возрастанием концентрации ЧСА в ликворе;

3. Относительно высокая (более 20%) бета-лактамазная активность СМЖ статистически значимо увеличивает вероятность неудачи стартовой эмпирической антибактериальной терапии, проводимой пациентам с бактериальными поражениями ЦНС, в 1,8–2,3 раза.

**Литература**

1. Abeylath, S.C. Drug delivery approaches to overcome bacterial resistance to beta-lactam antibiotics / S.C. Abeylath, E. Turos // Expert. Opin. Drug. Deliv. — 2008. — Vol. 5, № 9. — P. 931–949.

2. An investigation of the destruction of the beta-lactam ring of penems by the albumin drug-binding site / H. Bruderlein [et al.] // Can. J. Biochem. — 1981. — Vol. 59, № 10. — P. 857–866.

3. Catalytic mechanism of an abzyme displaying a beta-lactamase-like activity / B. Avalle [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2000. — Vol. 83, № 1–3. — P. 163–169.

4. Novel method for detection of b-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate / H.C. Callaghan [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. — 1972. — Vol. 1, № 4. — P. 283–288.

5. Pérez-Llarena, F.J. Beta-lactamase inhibitors: the story so far / F.J. Pérez-Llarena, G. Bou // Curr. Med. Chem. — 2009. — Vol. 16, № 28. — P. 3740–3765.

6. Sawai, T. Mechanisms of bacterial resistance to beta-lactams by beta-lactamases / T. Sawai // Nippon Rinsho. — 1997. — Vol. 55, № 5. — P. 1225–1230.
7. Walter, E. Hydrolysis of 3-Acetoxymethyl Cephalosporins by Lysed Whole Blood / E. Walter Wright, A. Judith Frogge // Antimicrob. Agents Chemother. — 1980. — Vol. 17, № 1. — P. 99–100.

## BETA-LAKTAMASE ACTIVITY OF LIQUOR AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE

**Zhiltsov I.V., Semenov V.M., Zenkova S.K., Vasilyeva M.A., Dmitrachenko T.I., Kubrakov K.M.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

The highest level of beta-laktamase activity of cerebrospinal fluid is detected in patients with subarahnoidal hemorrhagies, leading also to increased concentrations of serum albumin in spinal fluid. Therapy is discussed.

**Keywords:** beta-lactamase, subarahnoid hemorrhagies.

Поступила 04.09.2013

## СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ *ENTEROCOCCUSFAECALIS* В ПРИСУТСТВИИ СПЕРМАЛЬНЫХ ПОЛИАМИНОВ

**Карпунина Т.И., Николаева Н.В., Перова А.В., Богданов Ю.А.**

*ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия*

**Резюме.** Целью исследования явилось изучение ростовых характеристик и пленкообразующей способности культур *E. faecalis*, изолированных от условно здоровых и страдающих бесплодием мужчин, под влияниемразличных концентраций спермальныхполиаминов (спермина и спермидина), с учетом обусловленных ими изменений pH среды. Показано, что «стратегия выживания» различных по происхождению штаммов *E. faecalis* отличалась своеобразием, а именно продолжительностью лаг-фазы, интенсивностью накопления биомассы и формирующихся при этом биопленок.

**Ключевые слова:** *E. faecalis*, кривая роста, биопленки, спермин, спермидин.

**Введение.** К настоящему времени накоплен обширный материал, касающийся вопросов функционирования мужской репродуктивной системы в норме и при патологии.Считается установленным, что основными возбудителями инфекций урогенитального тракта мужчин, влекущих за собой развитие патоспермии, являются представители аутофлоры человека. Поскольку в структуре микроорганизмов, изолируемых из эякулята здоровых и больных бесплодием мужчин, доминируют представители условно патогенной флоры, очевидно, что дифференциация этиологическизначимых микроорганизмов от всех прочих должна основываться на выявлении качественных признаков, характерных для патогенных микроорганизмов [1].

Одной из интегральных биохимических систем, играющих важную роль в процессах репродукции, является набор полиаминов (спермин, спермидин, путресцин) [2–4]. Исследователи полагают, что в очень малых концентрациях окисленные производные полиаминов способны подавлять рост и размножение многих бактерий и вирусов. По мнению авторов, устойчивость бактерий к спермину и спермидину является высокоспецифичным маркером для патогенных бактерий, выделяемых из спермы, и ее определение позволит оценивать потенциальную патогенность изолированных культур [5]. Более того, полиамины влияют на пленкообразующую способность бактерий, способствуя их персистенции [6]. К тому же, присутствие упомянутых соединений существенно изменяет показатель кислотности среды, что, в свою очередь, в значительной степени сказывается на ростовых характеристиках большинства условно-патогенных микроорганизмов (УПМ).

Между тем, накопленная к настоящему времени информация о влиянии полиаминов на бактериальные клетки, выживаемости УПМ, в том числе, в секретах мужских репродуктивных органов, отличающихся высоким содержанием спермина и спермидина, весьма немногочисленна и достаточно противоречива.

**Цель** исследования: изучение влияния спермальныхполиаминов на рост и пленкообразующую способность бактерий, изолированных из спермоплазмы, *in vitro*.

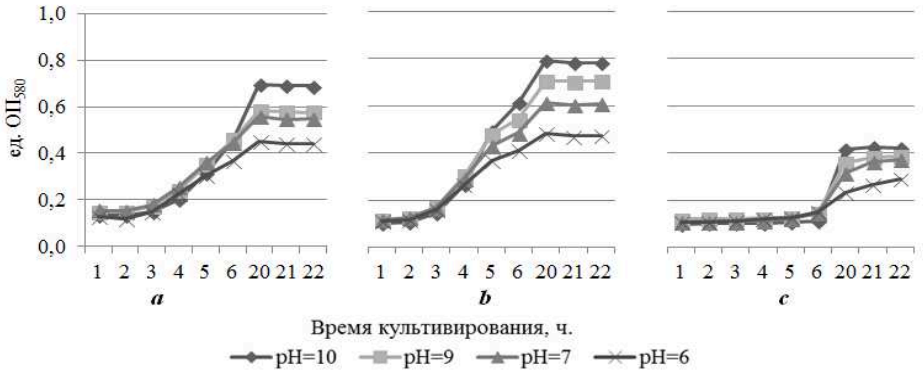
**Материалы и методы.** В работе были использованы штаммы *E. faecalis*, изолированные от больных и условно здоровых мужчин, а также штамм *E. faecalis* ATCC 29212, полученный из ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздрава РФ (Москва). Подобный выбор объясняется тем, что по результатам наших предшествующих исследований [7] при патоспермии, обусловленной УПМ, *E. faecalis* изолировали чаще других представителей аутофлоры. В тексте в качестве примеров приведены графические отображения ростовых характеристик штамма ATCC 29212, а также *E. faecalis* №№ 11 и 8, изолированных от больных и условно здоровых мужчин соответственно.

Ночные культуры *E. faecalis*, выращенные на бульоне Луриа–Бертани (LB-бульон) и стандартизованные до 0,5 по МакФарленду, количественно засевали в полистироловые плоскодонные 96-луночные панели (стандартизованную культуру разводили 1:100), содержащие компоненты, соответствующие задачам эксперимента; для контроля — чистый LB-бульон; LB-бульон с добавлением спермина и солянокислого спермидина, используя их двукратные разведения (от исходного раствора до разведения 1:32). Исходная концентрация соответствовала содержанию полиаминов в спермоплазме, установленному нами ранее: 0,04 мг/мл для спермидина и 0,5 мг/мл для спермина [8]. Для достижения необходимых показателей pH среды использовали соляную кислоту и гидроокись натрия. Ростовые характеристики исследуемых штаммов оценивали путем измерения оптической плотности (ОП) суспензий в опытных и контрольных лунках на мультимодальном планшетном ридере (Tecaninfinite M 200) через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 21 и 22 ч . По окончании наблюдений количество жизнеспособных микроорганизмов подсчитывали при высеве стандартных десятикратных разведений бактериальных взвесей на кровяной агар. Пленкообразующую способность штаммов изучали по методике O`Toole G.F. (2000) [9]. Полученные данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики. При статистической обработке результатов вычисляли среднее значение и его ошибку.

**Результаты и их обсуждение.** Отклик различных штаммов *E. faecalis* на воздействие спермальныхполиаминов с учетом pH среды изучали в серии экспериментов.

Первоначально было прослежено влияние pH среды на рост (рисунок 1) и пленкообразующую способность (рисунок 2) различных по происхождению культур. Как видно из представленных графиков, при pH=6 накопление биомассы всех трех штаммов было минимальным, а максимальные показатели ОП регистрировали при pH=10. В то же время кривые роста референтного штамма и E. faecalis № 8, выделенного от условно здорового пациента, были практически идентичны, а *E. faecalis* № 11, признанного этиопатогеном, отличала длительная фаза адаптации, и к концупервых суток показатели оптической плотности были практически вдвое ниже соответствующих величин, характеризующих два других варианта.

Интенсивность пленкообразования различными по происхождению штаммами отличалась весьма значительно (рисунок 2). Наиболее «мощную» пленку формировали, как правило, штаммы, изолированные от условно здоровых мужчин. Минимальную пленкообразующую способность демонстрировали культуры, рассматриваемые как этиопатогены.




Здесь и далее: a — *E. faecalis* ATCC; b — *E. faecalis* № 8; c — *E. faecalis* № 11

Рисунок 1 — Кривые роста *E. faecalis* при различных pH среды

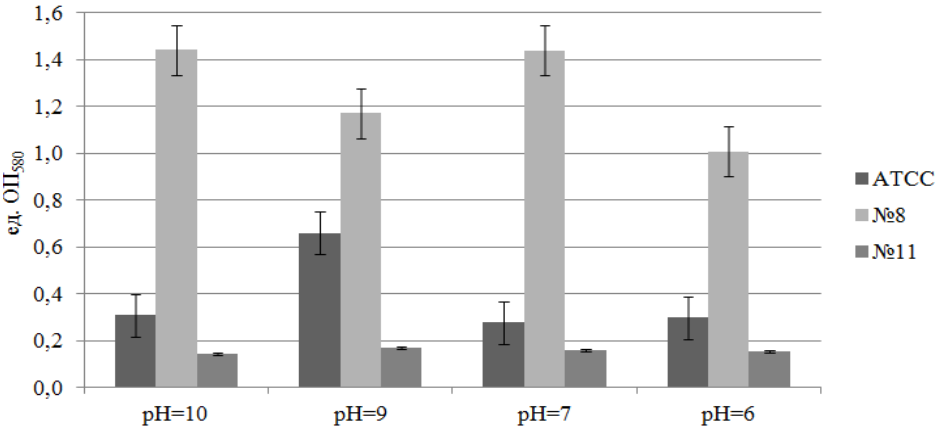



Рисунок 2 — Интенсивность пленкообразования *E. faecalis* взависимости от pH среды

В следующей серии экспериментов оценивали изменение ростовых характеристик штаммов *E. faecalis* при различном содержании спермина и спермидина при нейтральной реакции среды и с учетом ее защелачивания в присутствии полиаминов (рисунок 3).В нейтральной среде спермин практически не влиялна накопление биомассы всеми штаммами, но заметно уменьшал продолжительность фазы адаптации. Наиболее существенно это влияние сказывалось на культурах, изолированных от больных. В аналогичных условиях спермидин, напротив, во всех случаях пролонгировал лаг-фазу и приводил к значимому снижению накопления биомассы. Кривые роста, характеризующие отклик бактерий на действие различных концентраций спермина при соответствующих изменениях pH, отражали индивидуальные особенности их реакции. Вместе с тем, содержание спермина в среде 0,5 мг/мл, обусловливающее pH=10, вызывало удлинение лаг-фазы у всех штаммов, а уменьшение его концентрации в 2 раза (pH=9) сопровождалось наиболее высокими показателями ОП в стационарной фазе роста.

В присутствии сперминаснижалась массивность биопленок, формируемыхкультурами *E. faecalis* АТСС и № 8, а пленкообразующая способность штамма № 11 интенсифицировалась. В свою очередь, спермидин оказывал прямо противоположное влияние, стимулируя процесс пленкообразования у первых двух штаммов, в то время как пленкообразующая способность этиопатогеновоставаласьна уровне контроля вне зависимости от его концентрации.

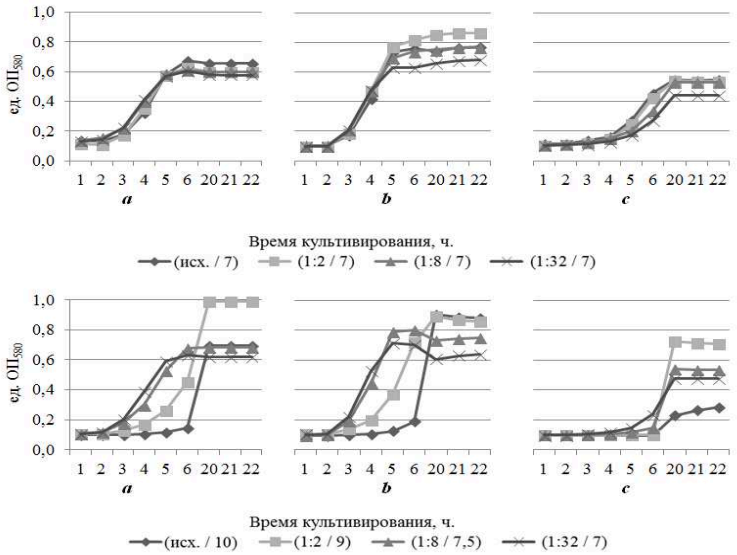



Рисунок 3 — Кривые роста *E. faecalis* в присутствии спермина при различных pH среды (разведение спермина/pH)

Наконец, было изучено совокупное влияние обоих полиаминов на *E. faecalis* в нейтральной

среде и при различных pH (Рис. 4) Отклик штаммов при pH=7 был однотипным: все они реагировали удлинением фазы адаптации и некоторым снижением ОП к концу первых суток. Заметным своеобразием отличались их реакции в зависимости от концентрации и pH среды. Для *E. faecalis* ATCC действие исходных концентраций при pH=10 оказалось губительным, а максимальные значения ОП регистрировали при pH=9, когда содержание спермина и спермидина было в 2 раза ниже. Именно в таких условиях и штаммы, изолированные от условно здоровых мужчин, «чувствовали» себя наиболее комфортно. Важно подчеркнуть, что наибольшее угнетающее влияние спермальныхполиаминовпрослеживалось в отношении штаммов, изолированных от больных. Их концентрации ——исходные и даже вдвое сниженные, обеспечивающие максимальный прирост биомассы в нейтральной среде — оказывали бактерицидный эффект на штаммы этиопатогенов, на что указывали результаты высева содержимого из соответствующих лунок на кровяной агар. Относительно благоприятными для выращивания подобных культур оказались условия с минимальным содержанием спермина и спермидина с показателями pH, близкими к нейтральным значениям.

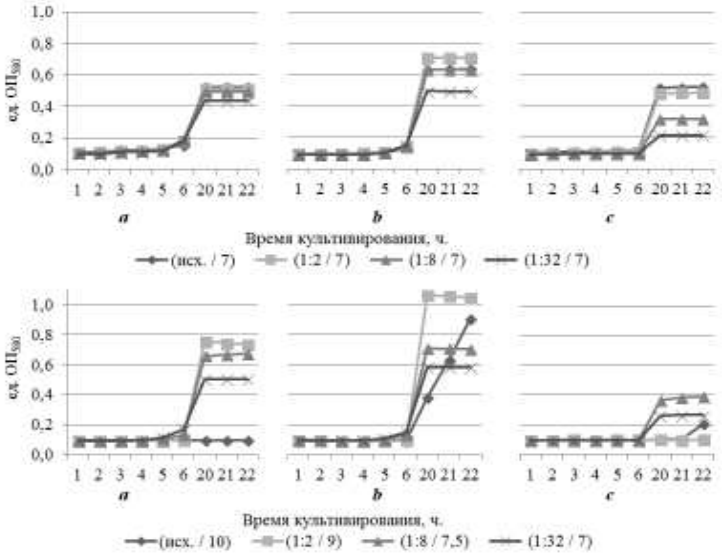



Рисунок 4 — Кривые роста *E. faecalis* в присутствии спермина и спермидина при различных pH среды (разведение полиамина/pH)

В присутствии в среде обоих полиаминов массивность биопленок, сформированных штаммами различного происхождения, была близка к регистрируемой при действии только одного спермина (рисунок 5).

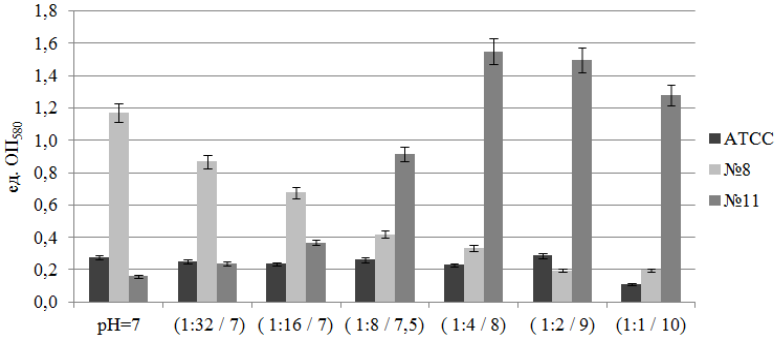



Рисунок 5 — Интенсивность пленкообразования *E. faecalis* в присутствии спермина и спермидинав разных разведениях и при различных pH (разведение полиамина/pH)

Однако их совокупное влияние обусловливало намного более четкую зависимость от концентрации вносимых веществ: чем выше было содержание полиаминов, тем более интенсивно они подавляли или стимулировали образование биопленки.

**Выводы.** Таким образом, установлено существенное своеобразие в отклике различных по происхождению штаммов *E. faecalis* на добавление спермальныхполиаминов в среду их культивирования.

Внесение по отдельности спермина или спермидина вызывало разнонаправленные эффекты в «стратегии выживания» исследуемых бактерий. Рост культур, изолированных от условно здоровых мужчин, характеризовался усиленным накоплением биомассы в присутствии спермина, коррелирующим с увеличением его концентрации, а процесс пленкообразования при этом сводился к минимуму. Культуры, выделенные от больных, под влиянием концентраций спермина, близких к физиологической норме, напротив, испытывали ингибирующее воздействие и переходили к сесильной форме существования, формируя наиболее массивные биопленки. Спермидин пролонгировал фазу адаптации «транзиторных» штаммов, снижая накопление их биомассы, а на этиопатогены значимого влияния не оказывал.

Складывается впечатление, что при совместном действии обоих полиаминов характер изменений в большей степени зависел от содержания спермина, который в наших экспериментах определял уровень кислотности среды. Несмотря на то, что энтерококки способны активно размножаться в широких диапазонах pH, эффект, производимый полиаминами, коррелировал с величиной этого показателя. Наиболее существенное влияние, как правило, прослеживалось при pH=9.

Полученные нами результаты и интерпретация эффектов, производимых полиаминами, не совпадают с подходами, предложенными Бойко О.В.и соавторами (2005), для дифференциации транзиторных и клинически значимых культурстафилококков. Тем не менее, наш опыт подтверждает целесообразность проведения подобных исследований для оценки этиологической значимости бактериальных культур, изолируемых от мужчин с репродуктивными проблемами.

**Литература**

1. Бойко, О.В. Методологические аспекты использования солянокислого спермина и спермидина для идентификации уропатогенной микрофлоры / О.В. Бойко, Н А.Терентьев, А.А. Николаев // Пробл. репродукции. — 2010. — № 3. — С. 77–79.

2. Lefèvre, P.L.C. Polyamines on there productive landscape / P.L.C. Lefèvre, M.F. Palin, B.D. Murphy // Endocrine Rev. — 2011. — Vol. 32, № 5. —P. 694–712.

3. Плосконос, М.В. Значение полиаминов в репродуктивной функции мужчин / М. В. Плосконос // Фундаментальные исследования. — 2004. — № 11. — С. 97–98.

4. Николаев, А.А.Содержание свободных полиаминов в спермоплазме фертильных и субфертильных мужчин / А.А.Николаев, М.В.Плосконос // Пробл. репродукции. — 2010. — № 3. — С. 80–82.

5. Пат. 2251691 Российская Федерация Способ определения патогенности микроорганизмов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных из спермы / О.В. Бойко, А.А. Николаев, М.В. Плосконос. М., 2005.

6. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm/ Ch.N. Patel [et al.] // J. Bacteriol. — 2006. — Vol. 188, № 7. — P. 2355–2363.

7. Микрофлора эякулята как потенциальная причина репродуктивных проблем / Т.В. Касимова [и др.] // Фундаментальные исследования. — 2012. — № 2. — С. 308–310.

8. Богданов, Ю.А. О диагностической значимости содержания полиаминов в эякулятеинфертильных мужчин при асимптомных воспалительных процессах / Т.И. Карпунина, Л.Ю. Нестерова, А.В. Ахова // Андрология и генитальная хирургия. — 2013. — № 3. — С. 19–22.

9. O`Toole, G.F. Biofilm formation as micribial development / G.F. O`Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // Ann. Rev. Microbiol. — 2000. — № 54. — P. 49–79.

## SURVIVAL STRATEGY OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* IN THE PRESENCE OF SPERM POLYAMINES

**Karpunina T.I., Nikolaeva N.V., Perova A.V., Bogdanov Y.A., E.A.Wagner**

*Perm State Medical Academy, Perm, Russia*

The purpose of the study was to examine the influence of the polyamines (spermine and spermidine) on growth features of *E. faecalis*, isolated from seminal plasma of healthy and infertility men, considering pH changes. It was shown, that survival strategy of *E.faecalis* strains different in origin had some peculiarities, mainly in the lag-phase duration, bacterial mass accumulation and biofilm formation.

**Keywords:** *E. faecalis*, growth curve, biofilms, spermine, spermidine.

Поступила 06.09.2013

# МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИСТООБРАЗОВАНИЯ СПИРОХЕТ *BORRELIA BURGDORFERI* НА ПРИМЕРЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК АСТРОГЛИИ

**Князева О.Р., Асташонок А.Н., Верещако Н.С., Квачева З.Б., Полещук Н.Н.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Целью данной работы являлось изучение этапов и особенностей цистообразования и механизмов проникновения в клетку *Borrelia burgdorferi sensu stricto* на примере культуры клеток астроглии. В результате исследований получена модельная системы, позволяющая изучить цистообразование *Borrelia burgdorferi sensu stricto in vitro*. Проведен ультраструктурный анализ спиралевидных и цистных форм в культуре астроглии и изучены механизмы проникновения возбудителя в клетку.

**Ключевые слова:** *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, Лайм-боррелиоз, цистообразование, электронная микроскопия.

**Введение.** Лайм боррелиоз — природно-очаговое, трансмиссивное, инфекционное, мультисистемное заболевание, вызываемое патогенными спирохетами рода *Borrelia burgdorferi sensu lato* [1]. В настоящее время в рамках единого вида открыто 18 геновидов боррелий [2]. Три из них считаются наиболее патогенными для человека: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*.

Заболевание характеризуется полиморфностью клинической картины, а также склонностью к хроническому и латентному течению. Неврологические симптомы возникают примерно у 15% не леченых пациентов с болезнью Лайма. Клинические проявления могут быть представлены энцефалитом, черепной невропатией и менингитом [3, 4]. Механизмы, с помощью которых *Borrelia burgdorferi* поражает нервную систему, изучены не в полной мере. Актуальность обусловлена тем, что повреждения, вызванные проникновением бактерий в клетки ЦНС, могут быть основой для целого ряда неврологических проявлений и заканчиваться развитием тяжелых состояний под общим названием нейроборрелиоз [5, 6]. Особого внимания заслуживает феномен возможного перехода классический спиралевидных форм боррелий в L-формы и цисты, способные длительно сохраняться в различных органах и тканях и активироваться при нарушении иммунологического надзора, стрессовых ситуациях или активации других патогенов ингибирующих активность иммуноцитов. Несмотря на накопленный опыт по изучению данной проблемы многие вопросы о патогенезе остаются неясными. Сегодня известно три механизма устойчивости боррелий в организме хозяина: 1) подавление иммуногенности поверхностных белков, с помощью механизма антигенной вариабельности; 2) инактивация эффекторных механизмов; 3) «укрытие» в менее доступных местах, какими является экстрацеллюлярный матрикс и цитоплазма некоторых клеток. Однако, механизмы взаимодействия возбудителя с клетками нервной системы, способность сохраняться в них и этапы морфологических преобразований до сих пор остаются недостаточно изученными [7]. Актуальность проблемы обуславливает необходимость расширения диагностического поиска с учетом региональных особенностей *B.burgdorferi s.l.*, и уточнение патогенетических механизмов развития паталогического процесса, что поможет в изучении клинических характеристик и совершенствованию тактики лечебно-профилактических мероприятий данной группы заболеваний.

**Целью** работы являлось изучение этапов и особенностей цистообразования и механизмов проникновения в клетку *Borrelia burdorferi sensu stricto* на примере культуры клеток астроглии.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм Gr 594 (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*), выделенный на территории Республики Беларусь. Спирохеты культивировали при 34°С в питательной среде BSK-H (модифицированная среда Barbour-Stoenner-Kelly), Sigma A8625, в состав которой входят смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, альбумина, цистеина, кроличьей сыворотки, желатина и другие компонентов. Посевная доза составляла $1\times10^6$ кл/мл. Контроль роста осуществляли на 2–6-е сут методом темнопольной микроскопии, путем подсчета клеток в поле зрения на микроскопе Biolam (Россия). Типирование проводили с использованием микробиологических (темнопольная микроскопия), иммунологических (с использованием флуоресцирующих антител) и молекулярно-генетических методов (полимеразная цепная реакция).

Для моделирования инфекции *in vitro* использовали культуру клеток глиомы крысы С-6, состоящую из 85–90% астроглиальных клеток и около 10% олигодендроцитов. Во флаконы со сфор-

мированным монослоем суточной культурой клеток С-6 вносили $1\times10^5$ кл/мл *Borrelia burgdorferi*. Затем удаляли инокулят и вносили среду МЕМ в модификации Дульбекко 1152 с циклогексимидом (2,0 мкг/мл). Инкубировали 120 ч при 33°С. Для исследования морфологии боррелий и культур клеток на каждом пассажном уровне приготовленные препараты окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали методом световой микроскопии при увеличении х400, х600, х100. Идентификацию наличия боррелий в пробах осуществляли методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием набора «НИФМ-Лайм-АГ» и люминесцентного микроскопа при увеличении х400, х1000 (NiconE50i, Япония). Приготовление препаратов для электронной микроскопии проводили после предварительного снятия монослоя культуры клеток. Клетки фиксировали в течение 3 ч в 2,5% глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,2М какодилатном буфере (рН 7,3), постфиксировали 1% раствором четырехокиси осьмия в течение 1 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в аралдит по общепринятой методике. Ультратонкие срезы толщиной 50-150 нм получали на ультратоме Ultracut E (Reichert, Австрия), монтировали на медные сеточки с формаваровой подложкой и окрашивали 1%-уранилацетатом и цитратом свинца по методу E.S. Reynolds. Полученные образцы исследовали на микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ.

**Результаты и их обсуждение.** Предварительная визуализация взаимодействия возбудителя с перевиваемыми клетками астроглии методами световой микроскопии позволила оценить численность и локализацию боррелий в препарате, а также дать характеристику состоянию монослоя. В процессе сокультивирования к 3-м сут было отмечено увеличение численности возбудителя с $1\times10^5$ до $1{,}2–1{,}3\times10^5$ кл/мл. Боррелии преимущественно располагались в межклеточном пространстве, однако некоторые из них начинали адгезироваться на поверхности клеток. К 5-м сут сокультивирования до 80% возбудителя было локализовано возле либо на их поверхности. Отмечен слабовыраженный цитопатический эффект в виде изменений отдельных астроцитов, сопровождаемый фрагментацией ядерного хроматина. В ядрах отдельных клеток визуализировались гиперхромные включения. Монослой культуры был сохранен.

Микроскопия препаратов окрашенных флуоресцеин-мечеными антителами позволила лучше визуализировать боррелии за счет специфического изумрудного свечения и оценить их локализацию в культуре клеток и морфологию. Установлено, что на 1–2-е сут на поверхности клеток астроглии отмечалась адгезия лишь единичных боррелий спиралевидной формы. К 5–6-м сут на поверхности клеток адгезировалось до 80% возбудителя и лишь 35–40% боррелий сохраняли спиралевидную форму, а остальные образовывали кольца, петли, частичные перекресты и плотные округлые структуры.

Для уточнения процессов протекающих при сокультивировании боррелий с астроцитами пробы были подвергнуты электронно-микроскопическому анализу. Боррелии, выявляемые на ультратонких срезах, находились на разных этапах морфогенеза и взаимодействия с клетками.

Ультраструктурный анализ показал наличие спиралевидных форм возбудителя расположенных в межклеточном пространстве, примыкающих к цитоплазматической мембране и внутриклеточно. Такие боррелий обладали всеми морфологическими особенностями, характерными для данного вида (клеточная стенка, флагеллы, протоплазматический цилиндр и др.).

Около 60% боррелий вошедших в срез обладали морфологически измененной морфологической структурой. Удалось проследить динамику структурных преобразований при формировании цистных форм. На начальном этапе на одном из концов возбудителя наблюдалось образовывание баллоновидного расширения и отмечалась гиперплазия клеточной стенки. При этом отмечалось втягивание и фрагментация протоплазматического цилиндра на множество сегментов. Фрагментированные цилиндры формировали укладку под гиперплазированной клеточной стенкой, которая в свою очередь подвергалась структурным преобразованиям, проявляющимися повышением осьмиофильности. Созревающие цисты округлялись и приобретали коккоидальную форму. Зрелые цисты в отличие от выше описаных имели сферическую форму и уплотненную трехслойную клеточную стенку. Внутри визуализировались везикулоподобные, грануловидные и нитевидные электронно-плотные структуры. Фибриллярный аппарат, базальное тельце, цитоплазматическая мембрана и сформированный протопласт отсутствовали.

Таким образом, в межклеточном и около мембранном пространстве наблюдались цисты морфологически сходные с цистами в бесклеточной среде описанными ранее [8, 9].

Изучение ультраструктурных аспектов проникновения боррелий внутрь цитоплазмы позволило выявить морфологическую основу становления начальных этапов инфекционного процесса на клеточном уровне. В местах контакта возбудителя с поверхностью мембраны клеток было отмечено формирование окаймленных клатрином ямок (рисунок 1). Наличие характерных клатриновых зерен в ямках на поверхности клеток и их контакт с возбудителем является специфическим маркером рецепторно-опосредованного эндоцитоза. Этот факт позволяет сделать вывод о том, что в данной модельной системе проникновение возбудителя может происходить путем его специфического взаимодействия с клеткой.

По краям некоторых клеток астроглии наблюдалось формирование расширяющихся булавовидных отростков морфологически сходных с псевдоподиями, состоящих из цитоплазмы (как правило, не содержащей клеточных органелл, эндоплазматического ретикулума) и четкой структурированной мембраны (рисунок 2). Эти отростки окружали как спиралевидные, так и цистные формы возбудителя, смыкались, формируя в подмембранном пространстве цитоплазмы включение, содержащие как фрагменты спиралевидных, так и цистные формы боррелий. Это свидетельствует о том, что возбудитель способен проникать в клетку путем фагоцитоза и сохраняться в них. Таким образом, боррелии способны проникать в клетки астроглии как путем рецептор опосредованного эндоцитоза, так и, вероятно, фагоцитозом.

Об описанных механизмах проникновения свидетельствует наличие в цитоплазме части клеток включений, содержащих поперечно вошедшие в срез боррелии, обладающие нормальной морфологической структурой (рисунок 3) и крупных атипичные вакуолизированные структуры ограниченных мембраной, занимающих до 1/8 объема цитоплазмы. Крупные включения внутри содержали отдельные цилиндрические образования, напоминающие остатки фрагментированных вегетативных форм боррелий, а также переплетения филоментоподобных и мембраноподобных структур и рибосомоподобных гранул (рисунок 4).

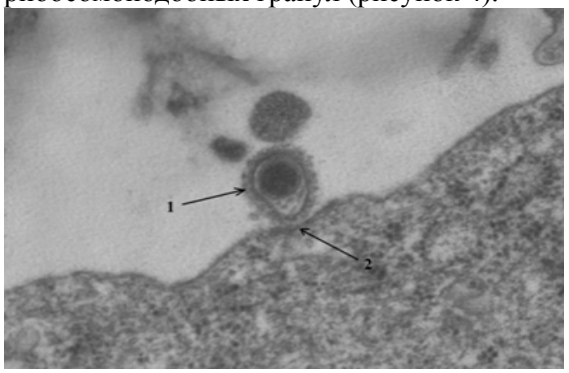



Рисунок 1 – Ультратонкий срез астроглиальной клетки. Ув. х60000. Рецептор опосредуемый эндоцитоз боррелии: 1) поперечный срез возбудителя; 2) клатриновые зерна

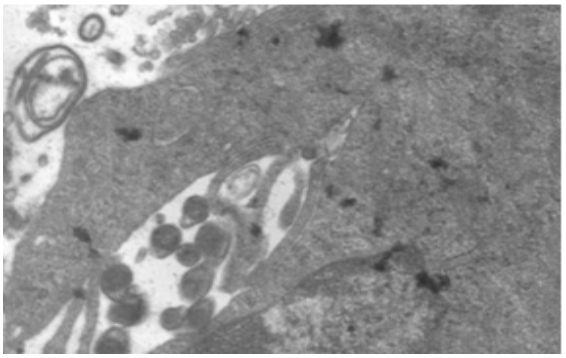


Рисунок 2 — Ультратонкий срез начального этапа фагоцитоза 1 — поперечный срез фагоцитируемых боррелий. Ув. х40000

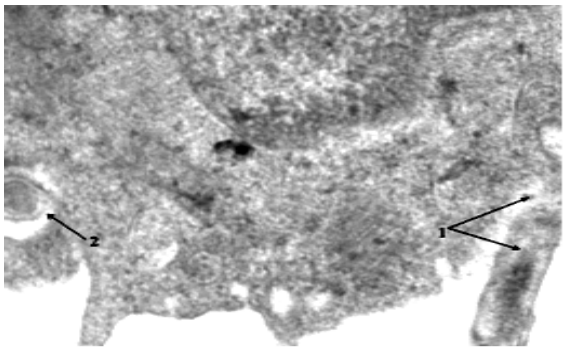



Рисунок 3 — Ультратонкий срез астроглиальной клетки. Ув. х60000. 1) Проникновение боррелии через мембрану клетки; 2) поперечный срез возбудителя, располагающегося внутри цитоплазмы

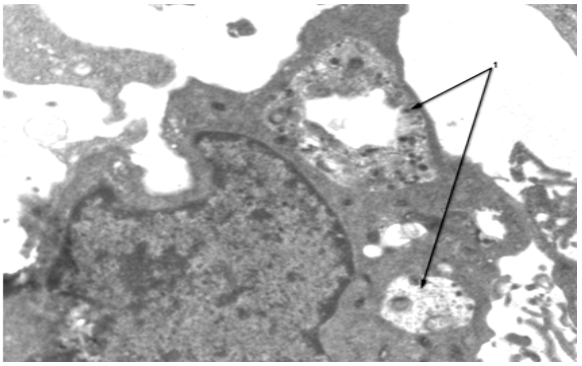


Рисунок 4 — Специфические включения в цитоплазме клеток культуры глиомы крысы, инфицированных штаммом *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Ув. х150000

**Выводы.** Таким образом, нами получена лабораторная модель, позволяющая изучать этапы цистообразования боррелий и их взаимодействие с клетками астроглиальной природы. Данная модельная система информативна для изучения тонких механизмов сохранения возбудителя в клетках и является перспективной в отношении дальнейших исследований по изучению закономерностей хронизации инфекции и возможности ее предупреждения.


**Литература**

1. Манзенюк, И.Н. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма) / И.Н. Манзенюк, О.Ю. Манзенюк. — Кольцово, 2005. — 85 с.
2. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* / G. Margos [et al.] // Inf. Gen. Evol. — 2011. — Vol. 7. — P. 1545–1563.
3. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii sp. nov.*, and group VS461 associated with Lyme borreliosis / G. Baranton [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1992. — Vol. 42. — P. 78–83.
4. First isolation of Borrelia lusitaniae from a human patient / M. Collares-Pereira [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — P. 1316–1318.
5. Borrelia valaisiana in cerebrospinal fluid / E. Diza [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2004. — Vol.10. – P. 1692–1693.
6. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis / J. Miklossy [et al.] // J. Neuroinfl. — 2008. —Vol. 25. — P. 5–40.
7. Concurrent neocortical borreliosis and Alzheimer's disease / A.B. MacDonald // Ann. NY Acad. Sci. — 1988. — P. 468–470.
8. Князева, О.Р. Ультраструктурная и наноскопическая характеристика цистообразования *Borrelia burgdorferi sensu stricto* в бесклеточной среде и культуре астроцитов / О.Р. Князева // Сб. науч. тр. «Современные проблемы инфекционной патологии человека». — Минск, 2012. — С. 308–313.
9. Князева, О.Р. Лайм-боррелиоз: ультраструктурные и наноскопические исследования цистообразования *Borrelia burgdorferi sensu stricto* / О.Р. Князева, А.Н. Асташонок, Н.Н. Полещук // Здравоохранение. — 2012. — № 12. — С. 11–16.


## THE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF GENERATING CYSTIC FORMS OF STRAIN OF *BORRELIA BURDORFERI SENSU STRICTO* IN CULTURE OF ASTROCYTES


**Kniazeva O.R., Astashonok A.N., Vereschako N.S., Kvatcheva Z.B., Poleshchuk N.N.**

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



The aim of our investigation was the study stages and superficial reorganization of structures of generating cystic forms of strain of *Borrelia burdorferi sensu stricto* in culture of astrocytes.

The modeling system of generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in culture of astrocytes in vitro is received. The ultrastructural analysis of cysts forms is carried out. The reorganization of structures and interaction cells are studied. This model will allow to study further superficial and antigenic transformations causing process of a change of immunogenic and pathogenic properties and mimicry of Borrelia burgdorferi and also to study mechanisms formation of chronic infection.



**Keyworlds:** *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, Lyme disease, cyst formation, astroglia, electron microscopy.

Поступила 04.09.2013


## ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПРИ ВЕТРЯНОЙ ОСПЕ У ДЕТЕЙ


**Крамарев С.А., Деев В.В., Выговская О.В.**

*Национальный медицинский университет им. акад. А.А. Богомольца, Киев, Украина*



**Резюме.** Проведено исследование уровня интерферона-α и интерферона-γ в сыворотке крови у 135 детей больных ветряной оспой и выявлено повышение их уровня в 2 и 11 раз соответственно по сравнению с группой сравнения. Также имеет место выраженный дисбаланс со стороны основных цитокинов. Отмечается повышение уровня IL-4 в 5 раз, IL-1β в 2,9 раза IL-6 в 7 раз, уровень ФНОα при первом исследовании был снижен в 3 раза, IL-2 в 2,2 раза. Уровень IL-8 и IL-10 имел тенденцию к снижению в остром периоде ветряной оспы.



**Ключевые слова:** ветряная оспа, дети, интерфероны, цитокины.


**Введение.** Ветряная оспа относится к одному из наиболее распространенных инфекционных заболеваний среди детского населения. До последнего времени она считалась «легкой» детской ин-

фекцией. Первыми обратили внимание на тяжелое течение заболевания у больных лейкемией в Японии [1]. Позже появились сообщения об осложнениях и летальных случаях, связанных с инфекцией и в других странах мира: США, Германии, Англии [2, 3].

Ветряная оспа (ВО) на сегодня рассматривается как важная медико-социальная проблема, поскольку при этом заболевании возможно развитие целого ряда осложнений, в первую очередь, обусловленных непосредственным воздействием вируса и присоединением вторичной бактериальной инфекции и летальный исход [4]. Вследствие общей восприимчивости и интенсивного капельного механизма передачи ветряной оспой болеют преимущественно дети дошкольного и младшего школьного возраста. По данным разных авторов из общего числа больных этой инфекцией дети до 7 лет составляют 75–84 %, до 10 лет — 92–95%. Максимум заболеваемости приходится на детей в возрасте 3–4 лет: на каждые 10 тыс. детей этого возраста болеет около 600–1000 человек [5, 6]. Средний показатель заболеваемости на 100 тыс. населения в крупных городах Украины составляет от 500 до 1100, в сельской местности заболеваемость в 3–4 раза ниже. В Украине ежегодно болеет ветряной оспой около 150 тыс. детей [6]. Тяжелое течение заболевания встречается у новорожденных и людей пожилого возраста. У взрослых риск возникновения осложнений в 25 раз выше, чем у детей [5, 6]. По данным одних авторов острый энцефалит развивается преимущественно у детей в возрасте 4–7 лет, по другим данным — только у детей первых 2 лет жизни. Частота регистрации острого энцефалита колеблется от 0,06 до 7,9% и составляет 1,7 на 100 тыс. больных [1, 2].

При ветряной оспе возможно развитие иммунопатологического процесса с развитием агрессии провоспалительных цитокинов, интерферонов, обуславливающих тяжесть заболевания и развитие осложнений [7, 8]. Цитокины влияют на развитие и состояние активации иммунных клеток, синтезируются в результате активации гена (например, после прохождения сигнала через Т-клеточный рецептор). Они действуют на специальные рецепторы и запускают таким образом свои сигнальные каскады. Время полураспада цитокинов в кровотоке измеряется минутами и секреция их тоже является кратким процессом, т.е. они действуют локально и на короткое время [9].

**Цель** работы: выявить особенности интерферонового и цитокинового статуса у детей с ветряной оспой в остром периоде болезни.

**Материалы и методы.** Под наблюдением находилось 135 пациентов в воздасте от 1 недели до 19 лет, находившихся на стационарном лечении в Киевской городской детской клинической инфекционной больнице с диагнозом ветряная оспа в 2011–2012 гг. Для верификации диагноза применялись клинические, эпидемиологические, серологические и молекулярные методы диагностики.

Уровень цитокинов: интерлейкина-1β (IL-1β), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, фактора некроза опухоли α (ФНОα), интерферона-α (IFN-α), интерферона- γ (IFN-γ) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием стандартных систем производства ООО «Цитокин» (СПб) в лаборатории патофизиологии и иммунологии Институт отоларингологии им. А.С. Коломийченка НАМН Украины (зав. лаборатории, д.м.н., проф. О.Ф. Мельников) при госпитализации, на 3–4 и на 5–7 дни пребывания пациентов в стационаре. Группу сравнения составили 15 практически здоровых детей в возрасте от 1 до 18 лет.

Лабораторные исследования проводились при поступлении, на 3–4 и на 5–7 сут от начала лечения в стационаре. Статистическая обработка результатов исследования выполнялась на компьютерах серии Pentium, с использованием пакета прикладных программ Statistica и 6.0 Microsoft Exel for Windows 4.0.

**Результаты и их обсуждение.** Среди больных ветряной оспой детей первого года жизни было 5,5%, 1–3 лет — 11,6%, 3–7 лет — 40,3%, 7–15 лет — 42,6%, 15–19 лет — 3,7%. Средний возраст заболевших составил 6,7±3,45 года. Мальчиков было 56,3%, девочек — 43,7%. Среди заболевших превалировала среднетяжелая форма заболевания (67,2%). У 30,5% пациентов отмечали тяжелую форму ветряной оспы. Заболевание легкой степени тяжести было отмечено лишь у 2,3% детей, которые были госпитализированы в стационар по эпидемиологическим показаниям (дети из дома ребенка, школы-интерната). В среднем больные были госпитализированы на 4-й день от начала заболевания. 9,5% детей были госпитализированы в первый день от начала болезни и 14,5% пациентов поступали в стационар после 7-го дня от начала болезни (с 8-го по 16-й день).

Среди всех госпитализированных в стационар осложнения встречались в 61,9% случаев. Среди осложнений ветряной оспы преобладали в 53,4% случаев вторичные бактериальные осложнения

(пиодермия, стоматит, пневмония, бронхит, средний гнойный отит, слизисто-гнойный конъюнктивит, абсцесс кожи, острый гастроэнтерит, инфекция мочевыводящих путей. В 27,4% детей отмечали поражение нервной системы в виде фебрильных судорог, острой мозжечковой атаксии, энцефалита, менингита. У 0,9% пациентов зарегистрировали поражение половых органов (эпидидимо-орхит, сальпинго-оофорит) и в 18,1% случаев — другие осложнения заболевания (тромбоцитопения, гепатит, миокардит, реактивная артропатия). Осложнения заболевания регистрировались у детей всех возрастов: в 32,8% случаев у детей в возрасте 3–7 лет, 29,6% — от рождения до 7 лет, 18,10% — у детей старше 7 лет. У детей первых трех лет жизни в 42,2% отмечали присоединение вторичной бактериальной инфекции и в таком же проценте случаев неврологические осложнения, у 15,6% детей — другие осложнения ветряной оспы. У детей в возрасте 3–7 лет среди осложнений превалировали в 49,2% вторичные бактериальные осложнения, в 31,8% детей этой возрастной группы встречались неврологические осложнения и в 19% пациентов другие осложнения болезни. У детей старше 7 летнего возраста среди осложнений также превалировали вторичные бактериальные осложнения, которые регистрировались в 60,7% случаев. У 29,5% детей отмечали неврологические осложнения и в 9,8% пациентов — другие осложнения ветряной оспы.

У 98,8% больных заболевание протекало в типичной форме и лишь в 1,2% — в атипичной форме. Среди атипичных форм зарегистрированы буллезная форма (у 0,4%), у 0,4% — геморрагическая форма и у 0,3% — пустулезная форма заболевания.

Изучение содержания интерферонов IFN-α и IFN-γ в сыворотке крови у детей показало их достоверное увеличение на протяжении всего острого периода болезни. При поступлении в стационар у детей с ветряной оспой отмечено повышение в 11 раз уровня в сыворотке крови IFN-γ (226,6 пг/мл, в группе сравнения 20 пг/мл), в 2 раза повышен уровень IFN-α (43,6 пг/мл, в группе сравнения — 28 пг/мл) ($p<0,05$) (рисунок 1).

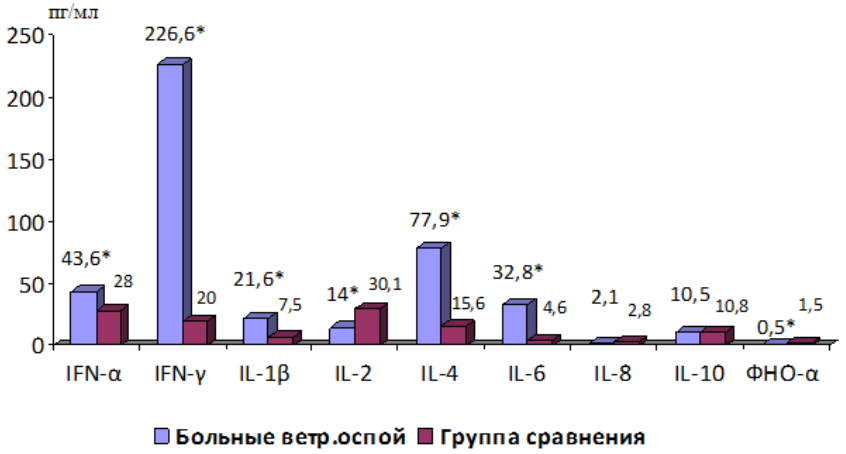



Рисунок 1 — Уровень интерферонов и интерлейкинов в сыворотке крови у детей больных ветряной оспой при поступлении в стационар; *— достоверное отличие показателей при $p<0,05$

Уровень IFN-α превышал референтное значение у 40,8% больных, был ниже у 29,6% детей и находился в пределах референтного значения у 29,6% пациентов. Уровень IFN-γ у 88,9% пациентов превышал референтное значение, у 3,7% был ниже и у 7,4% находился в пределах референтного значения при госпитализации. В остром периоде заболевания обнаружен дисбаланс со стороны противовоспалительных цитокинов — уровень IL-4 был повышен в 5 раз (77,9 пг/мл), IL-2 снижен в 2,2 раза (14,0 пг/мл) по сравнению со значениями параметров в группе сравнения (15,6 и 30,1 пг/мл соответственно) ($p<0,05$). Уровень IL-4 в 62,5% обследованных превышал референтное значение, в 37,5% был ниже, уровень IL-2 в 75% больных был ниже референтного значения, в 12,5% — выше, в 12,5% — в пределах референтного значения. При поступлении в стационар уровень IL-10 имел тенденцию к снижению (10,5 пг/мл) по сравнению с референтным значением (10,8 пг/мл) ($p>0,05$). Этот показатель в 75% пациентов был ниже референтного значения, в 25% — выше. Со стороны провоспалительных цитокинов отмечено снижение уровня ФНО-α в 3 раза (0,5 пг/мл), повышение уровня IL-1β в 2,9 раза (21,6 пг/мл), повышение уровня IL-6 в 7 раз (32,8 пг/мл) по сравнению с показателя-

ми в группе сравнения (1,5; 7,5 и 4,6 пг/мл соответственно) (p<0,05). Уровень IL-8 имел тенденцию к снижению (2,1 пг/мл) по сравнению с референтным значением (2,8 пг/мл) (p>0,05) (рисунок 1).

В динамике заболевания уровень IFN-α приблизился к референтным значениям на 3–4 день от начала пребывания в стационаре и составил 26,8 пг/мл (p>0,05) (рисунок 2). Уровень IFN-γ оставался повышенным и на 3–4 день от начала пребывания в стационаре его уровень составил 143,5 пг/мл, а на 5–7 день — 92,3 пг/мл (p<0,05) (рисунок 3).

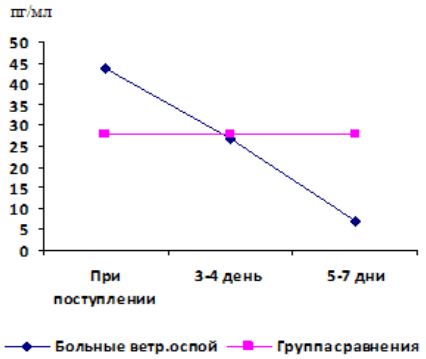



Рисунок 2 – Динамика уровня IFN-α в сыворотке крови у детей, больных ВО

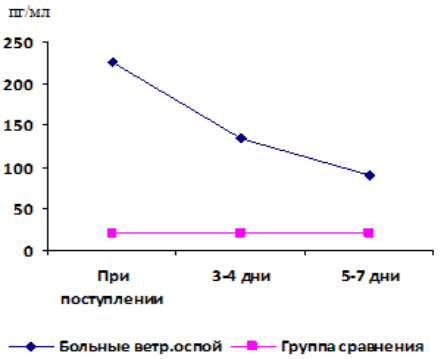



Рисунок 3 — Динамика уровня IFN-γ в сыворотке крови у детей, больных ВО

Со стороны основных цитокинов отмечали наростание изминений их уровня в сыворотке крови на высоте клинических проявлений заболевания по сравнению с их уровнями у детей в группе сравнения. В динамике заболевания дисбаланс со стороны основных противовоспалительных цитокинов усилился: уровень IL-4 оставался повышенными составил 49,9 пг/мл на 3–4 дни исследования, а на 5-7 день исследования его уровень снизился до 2,28 пг/мл (p<0,05) (рис.4). Уровень IL-2 на 3–4 дни исследования оставался сниженным (18,9 пг/мл), на 5–7 дни составил 0 пг/мл (p<0,05). Уровень IL-10 в сыворотке крови на 3–4 дни исследования снизился до 3,7 пг/мл, а к 5–7 дню исследования он равнялся 0 пг/мл (p<0,05) (рисунок 4).

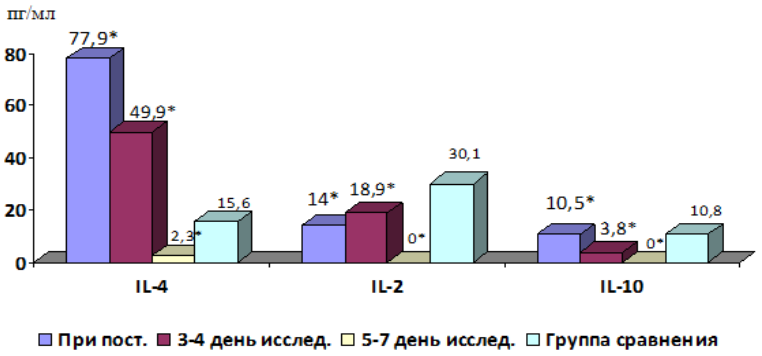



Рисунок 4 — Динамика уровня основных противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-2, IL-10 у детей больных ветряной оспой; *— достоверное отличие показателей при p<0,05

Со стороны основных провоспалительных цитокинов в динамике заболевания на пике основных симптомов заболевания также отмечено нарастание выявленного дисбаланса (рисунок 5). Так, уровень IL-1β в динамике еще больше повысился и достиг значения 35,4 пг/мл на 3–4 день исследования и 40,2 пг/мл на 5–7 день исследования (в группе сравнения 7,5 пг/мл) (p<0,05). Динамика со стороны уровня в сыворотке крови IL-6 отмечена такая же — его уровень на 3–4 день исследования составил 43,9 пг/мл и на 5–7 день 52,7 пг/мл соответственно (15,6 пг/мл в группе сравнения) (p<0,05). Уровень в сыворотке крови IL-8 в динамике болезни повысился и составил 18,6 пг/мл на 3–4 день исследования и 30,1 пг/мл на 5–7 день исследования (2,8 пг/мл в группе сравнения) (p<0,05). Со стороны уровня в сыворотке крови ФНО-α отмечена такая же динамика — 2,8 пг/мл на 3–4 день исследования, 8,5 пг/мл — на 5–7 день исследования (1,5 пг/мл в группе сравнения) (p<0,05) (рисунок 5).

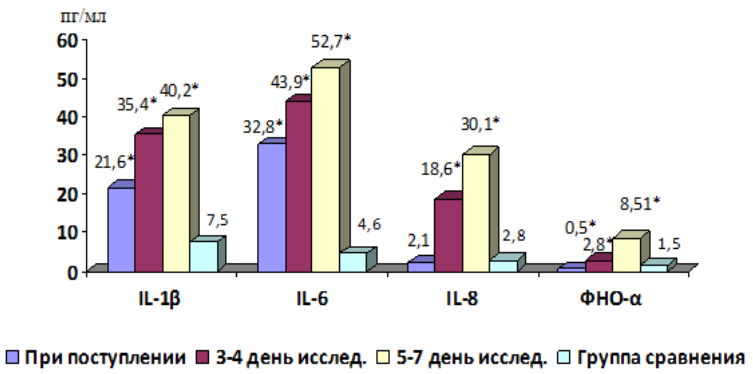



Рисунок 5 — Динамика уровня основных провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8, ФНО-α у детей больных ветряной оспой; *— достоверное отличие показателей при $p<0,05$

Многолетними исследованиями доказано, что цитокины, продуцируемые макрофаги и CD4+ клетками, играют решающую роль в регуляции эффекторных функций иммунокомпетентных клеток на антигенный раздражитель, в частности при развитии вирусной инфекции [9]. Клеточное звено иммунного ответа обусловлено, во первых, эффекторным цитотоксическим механизмом, приводящим к гибели зараженных вирусом клеток, в том числе и клеток самой иммунной системы; во вторых, генерация Т-хелперов первого типа — Th1 — индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов, которые стимулируют острофазовые реакции как на уровне всего организма, так и местного очага воспаления. Напротив, переключение иммунного ответа организма на гуморальный путь через экспансию Т-хелперов второго типа — Th2 — сочетается с антивоспалительным эффектом благодаря иммуносупресорному действию продуцируемых Th2 цитокинов — IL-4, -10 [9, 10]. Такой механизм контроля иммунного воспаления очень важен при высокой вирусной нагрузке, когда возникает риск развития тяжелой формы заболевания и осложнений [7, 8].

Общеизвестно, что ведущая роль в противовирусной защите организма от инфекций принадлежит системе интерферонов (IFN) — цитокинов, обладающих универсальными антивирусными свойствами [9, 10]. IFN и интерлейкины (IL) влияют на развитие и состояние активации иммунных клеток, являются молекулами близкого (паракринной) действия, то есть воздействуют на клетки, находящиеся в контакте, или даже на саму клетку, которые синтезирует (аутокринно действие), действуют на специальные рецепторы и запускают таким образом свои сигнальные каскады. Время полураспада цитокинов (интерферонов и интерлейкинов) в кровотоке измеряется минутами и секреция их тоже является кратким процессом, т. е. цитокины действуют локально и на короткое время. Интерфероны α и γ продуцируются клетками, зараженными вирусом. Они имеют токсический эффект для вируса, а также индуцируют повышенную экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) и клетками-мишенями пролиферацию В-лимфоцитов, усиливают активность естественных киллеров. Интерферон γ продуцируется Т-лимфоцитами. Он тоже обладает антивирусной активностью, активирует макрофаги, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, естественные киллеры, индуцирует экспрессию МНС I и II класса, усиливает секрецию антител. IL-1 производится активированными макрофагами и В-лимфоцитами, вызывает пролиферацию Т-клеток, дифференцировку пре-В клеток, пролиферацию и секрецию антител В-лимфоцитами, стимулирует пролиферацию фибробластов и эндотелиальных клеток, секрецию TNF эндотелиальными клетками, усиление продукции белков острой фазы. Считается главным цитокином воспаления, принимает участие также в заживлении ран. IL-2 продуцируемый Т-лимфоцитами считается главным регуляторным цитокином. Фактически, вместе с IFN-γ является активатором цитотоксической ветви иммунного ответа, вызывает пролиферацию и усиление цитотоксического действия активированных Т-лимфоцитов, усиление экспрессии рецептора к IL-2, продукцию других цитокинов Т-клетками, а также пролиферацию В лимфоцитов. IL-4 производится стимулированными Т-лимфоцитами, а также клетками стромы костного мозга и тучными клетками, вызывает пролиферацию активированных В-лимфоцитов и переключение изотипов иммуноглобулинов с IgM на IgG1 и IgE. В определенной степени IL-4 является антагонистом IL-2, усиливает фагоцитоз, представление антигена и продукцию IL-1, IL-6 и TNFα (цитокинов воспаления) в моноцитах. Биологическая роль IL-4 заключается в обеспечении развития

Th2 типа и усилении пролиферации В-клеток, что связано с регуляцией секреции иммуноглобулинов [9]. IL-6 продуцируемый Т-лимфоцитами, моноцитами, фибробластами, эндотелиальными клетками стимулирует рост и продукцию антител В-лимфоцитами, усиливает синтез белков острой фазы, экспрессию IL-2 и его рецептора и дифференцирования цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Рецепторы к IL-6 находятся также на нервных клетках, где этот цитокин проявляет свое нейротропное действие. IL-8 производится моноцитами, лимфоцитами, а также фибробластами, клетками кожи и эндотелиальными клетками. IL-10 продуцируемый Т-лимфоцитами и моноцитами, стимулированными липополисахаридом является антагонистом IFN-γ и IL-2, супресирует эффекторные функции макрофагов, снижает уровень экспрессии антигенов MHC II класса, вызывает пролиферацию В-лимфоцитов, тимоцитов и тучных клеток, дифференцировку В-лимфоцитов в клетки, секретирующие IgG4 [9, 10].

Считают, что преобладание Th2 иммунного ответа ассоциируется с неблагоприятным исходом вирусных инфекций [10]. В доступной нам литературе встречаются единичные работы по исследованию уровня и динамики основных цитокинов при ветряной оспе у взрослых [7, 8]. У детей больных ветряной оспой такие исследования нам не встречались. Лоскутова И.В. и Фролов В.М. (2006) провели исследования по изучению уровня основных интерлейкинов при осложненном течении ветряной оспы у взрослых [7]. Ими было установлено, что при осложненном течении заболевания наблюдается существенный рост концентрации провоспалительных (IL-2, ФНОα) цитокинов в сыворотке крови, причем имеет место обратная корреляционная связь между выраженностью повышения уровня провоспалительных цитокинов и степенью снижения некоторых клеточных показателей системного иммунитета, в частности количеством общей популяции Т-клеток (CD4+), что можно считать показателем развития вторичного иммунодефицитного состояния [7]. У пациентов с тяжелым течением ветряной оспы в острый период болезни авторами выявлено существенное понижение содержания IL-4 в сыворотке крови [7]. У больных ветряной оспой в острый период болезни обнаружены существенные расхождения содержания IL-4 в сыворотке крови в зависимости от тяжести клинического течения и наличия или отсутствия осложнений, причем отмечена обратная корреляционная взаимосвязь между уровнем цитокинов в крови и тяжестью болезни. У большинства обследованных концентрация цитокина IL-4 в крови была сниженной. В то же время высокий уровень этого цитокина наблюдался при развитии осложнений на фоне тяжелого течения ветряной оспы [7].

**Выводы:**

1. У детей с ветряной оспой в остром периоде болезни отмечена индукция системы интерферона, которая проявлялась в повышении уровня IFN-α и IFN-γ в сыворотке крови.

2. Повышение уровня IFN-γ в сыворотке крови отмечено у 88,9% пациентов, снижение у 3,7%, пребывание в пределах референтного значения у 7,4%.

3. Повышение в сыворотке крови уровня IFN-α отмечалось у 40,8%, снижение — у 29,6%, пребывание в пределах референтного значения — у 29,6%.

4. В остром периоде ветряной оспы у детей имеет место выраженный дисбаланс со стороны основных цитокинов.

5. Отмечается повышение уровня IL-4 в 5 раз, IL-1β — в 2,9 раза, IL-6 — в 7 раз, уровень ФНО-α при первом исследовании был снижен в 3 раза, IL-2 — в 2,2 раза. Уровень IL-8 и IL-10 имел тенденцию к снижению в остром периоде ветряной оспы.

6. Выявленные изменения, как в интерфероногенеза, так и в цитокинпродукции в остром периоде ветряной оспы требуют коррекции.

**Литература**

1. Hospitalizations for varicella in children and adolescents in a referral hospital in Hong Kong, 2004 to 2008: A time series study / J.Y. Chan [et al.] // BMC Public Health. — 2011. — Vol. 11. — P. 366.

2. Severe Complications of Varicella in Previously Healthy Children in Germany: A 1-Year Survey / Ch. Ziebold [et al.] // Pediatrics. — 2001. — Vol. 108. — P. 79.

3. Hospitalization for Varicella in the United States, 1988 to 1999 / K. Galil [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. — 2002. — Vol. 21. — P. 931–935.

4. Чудная, Л.М. Ветряная оспа: анализ проблемы и пути решения / Л.М. Чудная, А.И. Гриневич // Сучасні інфекції. — 2000. — № 2. — С. 117–120.

5. Ющук, И.Д. Ветряная оспа взрослых / И.Д. Ющук, Н.В. Астафьева, М.А. Бурчик // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2000. — № 3. — С. 35–37.

6. Крамарев, С.А. Особенности современного течения ветряной оспы у детей / С.А. Крамарев // Дитячий лікар. — 2011. — № 6 (13). — С. 1–4.
7. Лоскутова, И.В. Уровень провоспалительных цитокинов у больных с осложненным течением ветряной оспы / И.В. Лоскутова, В.М. Фролов // Українськ. мед. альманах. — 2006. — Т. 9, № 4. — С. 78–80.
8. Фролов, В.М. Иммунные нарушения у больных ветрянной оспой и их коррекция / В.М. Фролов, А.М. Петруня // Патогенетические основы лечения острых инфекционных заболеваний. — М., 1994. — Вып. 3. — С. 123–128.
9. Фрейдлин, И.С. Цитокины и межклеточные контакты в противоинфекционной защите организма / И.С. Фрейдлин // Сорос. образ. журн. — 1996. — Т. 7. — С. 19–25.
10. Чуклин, С.Н. Интерлейкины / С.Н. Чуклин, А.А. Переяслов. — Львов: Лига-Пресс, 2005. — 481 с.

## INTERFERON AND CYTOKINE STATUS IN CHILDREN WITH CHICKENPOX

**Kramarev S.A., Deev V.V., Vygovskaya O.V.**
*National Medical University named after A.A. Bogomoletz, Kiev, Ukraine*

Observed 135 children with chicken pox at the age of 1 week to 19 years of life. A study of the level of IFN-α and IFN-γ in the serum of patients with chicken pox and found an increase in their level of 2 and 11 times, respectively. In the acute period of chicken pox in children there is a marked imbalance of the major cytokines. Show increased levels of IL-4 to 5 times, IL-1β — 2,9 times IL-6 — 7 times. The level of TNFα in the first study, was reduced to 3 times, IL-2 to 2.2 times. The level of IL-8 and IL-10 tended to decrease in acute period of chicken pox. Identified changes in interferon and in cytokines in acute period of chicken pox require correction.
**Keywords:** chicken pox, children, interferons, cytokines.

Поступила 02.09.2013

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕСИИ ГЕНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИЗАТОВ КУЛЬТУР *S. AUREUS*, *CANDIDA ALBICANS* И *STR. PYOGENES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОЖНЫХ БЛЯШЕК ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ

**Левченя М.В., Титов Л.П.**
*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе исследовано влияние лизатов микробов, выделенных из кожных бляшек пациентов с псориазом, на уровень экспрессии генов мононуклеарных лейкоцитами методом ДНК-биочипов. Полученные данные свидетельствуют о наличии общих для исследуемых патогенов молекулярных механизмов активации/супрессии генов при взаимодействии мононуклеарными лейкоцитами крови человека. Данное исследование также отражает информацию о ряде новых генов, важных для понимания механизмов взаимодействия в системе патоген-хозяин.
**Ключевые слова:** биочип, мононуклеарные лейкоциты, экспрессия генов, псориаз, лизаты микроорганизмов.

Молекулярные взаимодействие в системе патоген-хозяин проявляется в виде множества механизмов на уровне генов и кодируемых ими белковых молекул. Изучение молекулярно-генетических взаимодействий характеризуется сложностью и требует комплексного подхода. Для раскрытия молекулярно-генетических механизмов взаимодействия патогенных микробов с организмом человека все шире применяются методы геномики, протеомики и биоинформатики.

Изучение процессов распознавания молекулярных паттернов микробов иммунокомпетентными клетками, формирование активационных и супрессорных сигналов представляется важным для установления механизмов и понимания роли данных факторов в процессах роста, дифференцировки и ответной реакции клеток в норме и при патологических состояниях. Рецепторы клеток, цитокины и другие регуляторные молекулы формируют сложную сеть внутри- и межклеточных взаимодействий при реализации ответных реакций на молекулярные структуры микробов. Естественно, что для выяснения их биологической роли необходимо исследовать как можно большее число генов [1].

Лизаты бактерий широко используются в экспериментальных исследованиях в области иммунологии, а также при создании иммуномодуляторов для лечения кожных, респираторных или мочеполовых инфекций. Однако механизмы взаимодействия отдельных структур бактерий, равно как и их лизатов с иммунокомпетентными клетками раскрыты недостаточно [1].

При колонизации биотопов организма человека микробные популяции вступают в тесный контакт с клетками хозяина, что у части субъектов вызывает развитие локальных иммуновоспалительных реакций на продукты жизнедеятельности данных микробов (экзо- и эндотоксины, ферменты, нуклеиновые кислоты). Наиболее значимыми из них представляются стафилококковый энтеротоксин (SEB) и стрептококковый энтеротоксин (SPEs), а также β-гликаны, маннаны и фосфолипоманнаны кандид. Указанные молекулы являются значимыми стимуляторами иммунокомпетентных клеток и триггерами локального иммуновоспалительного процесса при псориазе.

**Целью** данного исследования являлось изучение экспрессии генов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови (МЛПК) под действием лизатов микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* методом микроаррэй. Вышеперечисленные микробы были выделены из зон псориатического воспаления.

**Материалы и методы.** Выделение и культивирование мононуклеаров периферической крови (МПК) человека. Мононуклеары периферической кровичеловека выделяли из венозной гепаринизированой крови путём наслаивания 6 мл крови на 3 мл гистопака и центрифугировали в течении 30 мин при 600 g. Фракцию мононуклеаров отбирали на границе раздела слоев градиента. Клетки дважды отмывали путем центрифугирования в фосфатно-солевом буфере (PBS) следующего состава (в mM): NaCl — 137, $Na_2HPO_4$ — 8, KCl — 2.7, $KH_2PO_4$ — 1.5, затем клетки подсчитывали в камере Горяева.

***Получение лизатов микроорганизмов.*** Культуры микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* выделены из мазков взятых из участков псориатического поражения у пациентов стационара. Селективной средой для выделения стафилококков являлся желточно-солевой агар (ЖСА), для выделения дрожжей использовали среду Сабуро с добавление гентамицина 500 мг/л. Стрептококки выделяли на кровяном агаре. Чистые культуры выращивали в течение суток в необходимых количествах и трехкратно отмывали. Лизаты микробов получали путем многократного замораживания-оттаивания в жидком азоте. Полученные лизаты фильтровали через бактериальный фильтр 0,22 мкм. Лизаты стандартизовали по содержанию белка фотометрическим методом с помощью набора (Roti-Quant, Carl Roth). В качестве стандарта для калибровочной кривой использовали овальбумин в концентрациях от 1 до 1000 мкг.

***Стимуляция мононуклеаров периферической крови.*** $1\times10^8$ клеток мононуклеарных лейкоцитов переносили в лунку культурального планшета и ресуспензировали в 2 мл среды RPMI-1640 (Invitrogen, Канада) обогащенной 10% фетальной сывороткой, 2 mM глютамином и 25 mM хепесом, и культивировали 16 ч при 37°C в атмосфере 5% $CO_2$. Для стимуляции мононуклеарных лейкоцитов использовали лизаты клеток *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* в концентрации 100 мкг в пересчете на белок на 1 мл культуральной жидкости. Все эксперименты проводились в 3-кратной повторности.

***Выделение РНК и оценка экспрессии генов иммунной системы МЛПК.*** МЛПК отмывали 2 раза от культуральной среды в фосфатно-солевом буфере. РНК из мононуклеаров периферической крови выделяли с помощью «TRI-reagent» («SigmaAldrich», США) в соответствии с инструкцией производителя. Качество выделенной РНК проверяли электрофоретически, концентрацию РНК и ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop.

***Получение и мечение комплементарной ДНК (кДНК).*** Комплементарную мРНК ДНК получали в реакции обратной транскрипции (ОТ) с использованием набора SuperScript Plus Direct cDNA Labeling System (Invitrogen), содержащего фермент Superscript III (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молонея), в соответствии с рекомендациями производителя. После окончания реакции кДНК очищали с помощью колонок (Low Elution cDNA) и элюировали в 20 мкл $dH_2O$. Концентрация однонитевой кДНК в пробах составляла не менее 10 мкг/мкл.

***Проведение гибридизации.*** Биочип для проведения исследований представлял собой стеклянный слайд, разработанный совместно с компанией ArrayIT, на поверхности которого размещен в нескольких проворностях массив из 652 генов. 5 мкл синтезированной меченной кДНК денатурирова-

ли в 10 микролитрах гибридизационного буфера (ArrayIT, США) и наносили на реакционную зону биочипа. Биочип помещали во влажную гибридизационную камеру ArrayIT (Калифорния, США) на 12 ч при температуре 42°С. После инкубации слайды отмывали и высушивали.

***Сканирование.*** Биочипы сканировали с помощью сканнера Innoscan 700 (Carbone, Франция) при разрешении 3 мкм и мощностью сканера 40% от номинальной при длине волны 540 нм. Интенсивность флюоресценции учитывали с помощью программы Mappix v.4.5.0.

***Обработка данных.*** Изображение и относительные значения интенсивности флюоресценции для каждого гена получали с помощью программного обеспечения Mappix 4.5.4. и сохраняли в текстовом формате для последующего анализа и обработки в пакете Microsoft Office 2010. На рисунке 1 показан фрагмент реакционной зоны биочипа после гибридизации с AlexaFluor 555-меченной кДНК. Данные нормализировали по суммарной интенсивности 652 элементов методом регрессивного анализа (SigmaPlot) [3]. Статистические расчёты и кластерный анализ проводили в программе Multi Experiment Viewer Mev v.4.8 (www.tm4.org). При проверке статистических гипотез наличие статистической значимости определено при значении $p<0,05$ для t-теста.

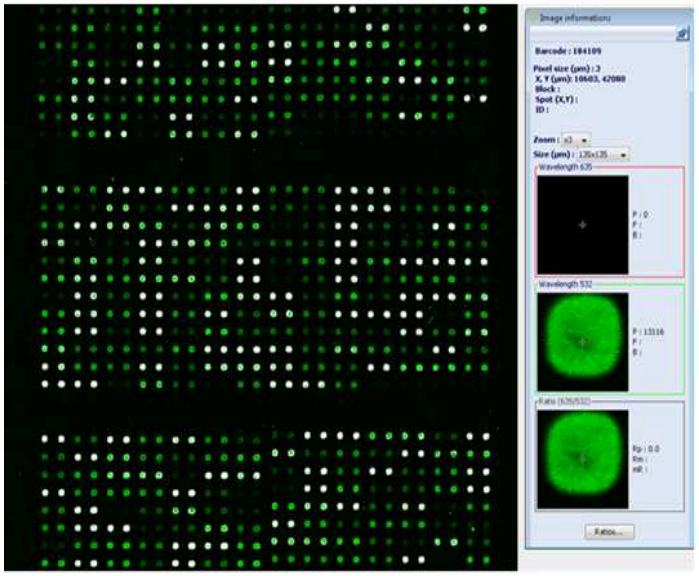


Рисунок 1 — Фрагмент отсканированного биочипового слайда. Яркость флюоресценции точек отражает уровень экспрессию генов. Гены с высокой экспрессией имеют высокий уровень флюоресценции

**Результаты и их обсуждение.** Динамика активации генов иммунного ответа МЛПК, стимулированных лизатами микроорганизмов. В результате гибридизации кДНК на биочиповых слайдах получены профили экспрессии генов для каждой из исследуемых проб. На основе статистического анализа интенсивности флуоресценции спотов 652 генов МЛПК при взаимодействии с лизатами микробов выделено 2 группы генов: со сниженной экспрессии 0–0,7 от контрольных значений, с увеличенной экспрессией 1,5 и выше контрольных значений. На диаграммах Венна рис.2 отражена динамика экспрессии генов при стимуляции клеток лизатами различных микробов. Численные значения и площадь пересечения диаграмм Венна отражают количественные изменения экспрессии генов в эксперименте.

Выявлено также усиление экспрессии генов, кодирующих белки транспортных каналов — solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters) и solute carrier family 20 (phosphate transporter). Активизация данных генов свидетельствует об усилении метаболических процессов в клетках МЛПК при взаимодействии с лизатами микробов.

Усиливается экспрессия гена васкулярного эндотелиального фактора роста сосудов мононуклеарными лейкоцитами под действием лизатов микроорганизмов. Как известно, активизация ангиогенеза в зонах воспаления и поражения при псориазе является маркером прогрессирования заболевания. В микроваскулярном русле пораженной кожи наблюдается расширение и повышения проницаемости сосудов, возрастает пролиферация эндотелиальных клеток, усиливается миграция лейкоцитов из крови в воспалительные фокусы кожи и обратно [5].

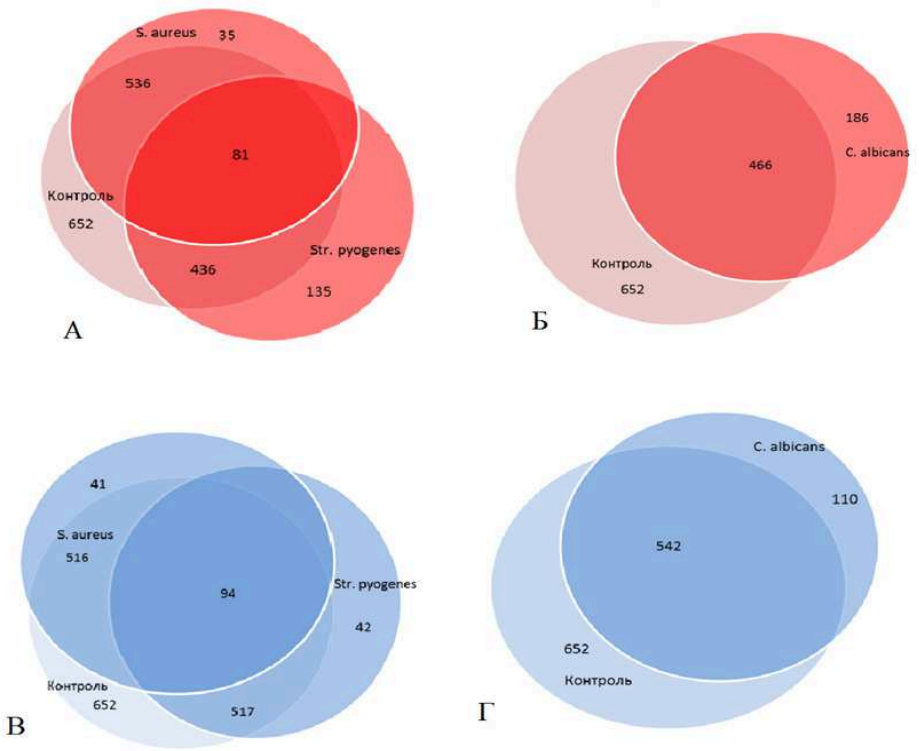



Рисунок 2 — Диаграмма Венна для генов с повышенной (А, Б) и сниженной (В, Г) экспрессией

Как видно из рисунка 2 А–Г наблюдаются существенные различия в экспрессии генов мононуклеарными лейкоцитами при добавлении лизатов микробов в экспериментах по сравнению с контролем. Сокультивирование МЛПК с лизатами дрожжей *Candida albicans* вызвало усиление экспрессии 186 генов последними. Бактериальные лизаты *S. aureus* и *Str. pyogenes* усилили экспрессию 116 и 216 генов МЛПК соответственно. Следует отметить общую направленность биологического эффекта лизатов на изменение экспрессии генов МЛПК, например для лизатов стрептококка и стафилококка обнаружено 81 общих генов-мишеней с повышенной экспрессией.

Выявлено 110 генов (рисунок 2) мононуклеаных лейкоцитов со сниженной экспрессией при взаимодействии с лизатами дрожжей *C. albicans*. Под действием лизатов бактерий *S. aureus* и *Str. pyogenes* установлено снижение экспрессии МЛПК 136 и 137 генов соответственно.

Значения интенсивности флуоресценции контрольных и опытных проб были подвергнуты дальнейшему анализу статистическими методами для выявления генов достоверно меняющих экспрессию в 3-х вариантах эксперимента (t-тест для групп, $p<0,01$).

В результате анализа нами выявлено 2 группы генов МЛПК с достоверно ($p<0,01$) высокой ($n=31$) и низкой экспрессией ($n=16$) по сравнению с контролем рисунок 3.

Молекулярные компоненты лизатов исследованных микроорганизмов при взаимодействии с мембранными рецепторами мононуклеарных лейкоцитов инициируют множественные сигналы разной степени интенсивности и направленности. Данные сигналы часто дублируются или конкурируют функционально, что завершается проведением сигналов в ядро и активизацией соответствующих транскрипционных факторов. Транскрипционные факторы регулируют транскрипцию генов или групп генов в зависимости от их количества и биологической активности.

Рисунок 3 — Динамика экспрессии генов мононуклеарными лейкоцитами при взаимодействии с микробными лизатами. Шкала интенсивности флуоресценции, отражающая степень экспрессии генов, меняется от яркого зеленого (низкая) до яркого красного (высокая)

Выявлена усиление активности генов, связанных с распознаванием, опсонизацией и фагоцитозом чужеродных микроорганизмов. При взаимодействии с микробами активизируются гены, кодирующие белки классического пути активации системы комплемента (C1q.1, C1RL и C2), а также генов альтернативного пути активации комплемента DF (complement factor D), участвующего в образовании C3 и C5 конвертаз.

Молекулы адгезии вовлечены во многие процессы жизнедеятельности клетки: межклеточные контакты, адгезия к внеклеточному матриксу, дифференцировку клеток, эмбриогенез, рост, распознавание антигенов, миграция. Выявлена повышенная экспрессия МЛПК под действием лизатов микробов молекул адгезии интегрина альфа E, рецептора ламинина, синаптотагмина.

Существенно повышена экспрессия транскрипционного фактора NFATC4 и фактора репликации C мононуклеарными лейкоцитами под действием лизатов микробов. Транскрипционный фактор участвует в транскрипции большинства цитокиновых и других индуцибельных генов в ходе иммунного ответа, контролирует процессы пролиферации, дифференцировки и реализации эффекторных функций, а также запрограммированной гибели клеток.

Установлено повышение экспрессии гена митогенактивированной протеинкиназы (MAPK1), регулирующей множество внутриклеточных процессов связанных с пролиферацией и дифференцировкой клеток. Среди генов клеточного цикла и апоптоза отмечено усиление экспрессия генов сериновых протеиназ (CASP6, caspase 1), циклинов и их киназ (cyclin D1, cyclin H, cyclin-dependent kinase 4), белков клеточной гибели и апоптоза (death associated protein 3, ubiquitin B). Многие из вышеперечисленных генов ассоциируются сактивизируются в зонах воспаления у пациентов с псориазом [5].

Выявлено также усиление экспрессии генов, кодирующих белки транспортных каналов – транспортеров solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters) и solute carrier family 20 (phosphate transporter). Активизация данных генов свидетельствует об усилении метаболических процессов в клетках МЛПК при взаимодействии с компонентами бактерий.

Следует отметить, что эндотелальные клетки весьма чувствительны к сигналам ангиогенеза, таким как TGF-a, TNF-a, фактор стимуляции ангиогенеза эндотелиальных клеток, васкулярный эндотелиальный фактор, а также хемокинам (IL-8 и др.). Как правило, данные факторы продуцируют-

ся эпителиальными клетками, фибробстами и кератиноцитами. В работе [5] выявлена гиперэкспрессия данных ростовых факторов в биопсийных образцах кожи пациентов страдающих псориазом.

Выявлено снижение экспрессии МЛПК ряда генов, ответственных за раннюю их активацию (CD69 поверхностная молекула). Поверхностные рецепторы В и Т клеток, некоторые МНС молекулы, сигнальные молекулы оказались репрессированными. Среди данных генов следует отметить снижение экспрессии МНС молекул, таких как HLA-B, HLA-DMA, HLA-DRA участвующих в презентации антигена иммунокомпетентными клетками.

Профиль экспрессии генов мононуклеарных лейкоцитов, полученный в *in vitro* эксперименте указывает на возможность использования потенциала данных генов как биомаркеров диагностики заболевания и оценки эффективности терапевтических мероприятий. Вместе с тем, методы выделения и особенности культивирования мононуклеарных лейкоцитов могут сказаться на профиле экспрессии генов. Экспрессионный профиль изолированных мононуклеарных лейкоцитов в культуре исключает взаимодействии с многими другими типами иммунокомпетентных клеток.

**Выводы.** Метод биочипов, использованный в работе для изучения экспрессии генов МПК при взаимодействии с бактериальными лизатами, показал достаточную эффективность и информативность. Установлено изменение экспрессии генов МЛПК под действием лизатов микробов, относящихся к различным функциональным группам (кластерам). Многие из выявленных в эксперименте генов с увеличенной и сниженной экспрессией играют роль в развитии воспаления в зонах псориатических бляшек. Таким образом, при тесном контакте микроба с организмом хозяина в зонах воспаления при псориазе наблюдается локальная иммунная реакция на микробные антигены, что способствует хроническому воспалению, приводящему к затяжному течению болезни. Влияние лизатов различных патогенов на экспрессионный профиль мононуклеарных лейкоцитов имеет схожее направление, активируются гены транскрипционных факторов, цитокинов хемокинов и их рецепторов, снижается экспрессия некоторых лимфоцитарных поверхностных рецепторов, ответственных за раннее распознавание микробов.

**Литература**

1. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies / A.M. Bowcock [et al.] // Hum. Mol. Genet. — 2001. — Vol. 10. — P. 1793–1805.

2. Gene expression profiles in psoriasis: analysis of impact of body site location and clinical severity / V. Quekenborn-Trinquet [et al.] // Br. J. Dermatol. — 2005. — Vol. 152. — P. 489–504.

3. Causton, H.C. Microarray gene expression data analysis / H.C. Causton, J. Quackenbush, A. Brazma. — Blackwell, 2003.

4. Schena, M. Microarray Analysis. First Textbook on Microarray Analysis / M. Schena. — 1st ed. — NJ: J. Wiley & Sons, Hoboken, 2003. — 648 p.

5. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear leukocytes from psoriasis patients identifies new immune regulatory molecules / D. Koczan [et al.] // Eur. J. Dermatol. — 2005. —Vol. 15. — P. 251–257.

## INVESTIGATION OF GENE EXPRESSION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS UNDER THE *S. AUREUS*, *CANDIDA ALBICANS* AND S*TR. PYOGENES* LYSATES ISOLATED FROM THE SKIN OF PATIENTS WITH PSORIASIS PLAQUE

**Liauchenia M.V., Titov LP.**

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

The study deals with investigating of the influence of bacteria lysates, isolated from the skin of patients with psoriasis plaques, on the level of gene expression of mononuclear leukocytes by DNA microarray. The findings suggest the presence the common molecular mechanisms of activation/suppression of genes in the interaction of human blood mononuclear leukocytes. The study also reflects new information of several new genes which might highlight the mechanism of bacteria-host interaction

**Keywords:** biochip, mononuclear cells, gene expression, psoriasis, lysates of microorganisms.

Поступила 06.09.2013

# ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПО СПОСОБНОСТИ РАЗРУШАТЬ ПЕПТИДОГЛИКАН У ПАЦИЕТОВ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

**Окулич В.К., Земко В.Ю., Кирилюк О.Д.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** Было исследовано 14 сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями, находившихся на лечении в отоларингологическом и офтальмологическом отделениях Витебской областной клинической больницы, и 32 сыворотки здоровых доноров. Разработана методика, позволяющая определять антимикробную активность сыворотки крови пациентов по ее способности разрушать пептидогликан. Установлено, что способность разрушать пептидогликан достоверно выше у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями ($p<0,05$), чем у доноров.

**Ключевые слова:** дефензины, *E. coli* ATCC 25922, пептидогликан.

**Введение.** Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) представляют собой небольшие молекулы, построенные из аминокислот. Они являются важной составляющей врожденной иммунной системы эукариот, которая обеспечивает защиту против патогенов. В клинической лабораторной практике определение уровней АМП может быть полезно в качестве маркеров системной активации нейтрофилов, при мониторинге течения инфекционных и воспалительных заболеваний. На сегодняшний день у человека обнаружено три семейства пептидов-антибиотиков — дефензины, кателицидины и гистатины. Среди дефензинов (ДН) млекопитающих выделяют две основные группы: альфа- и бета-дефензины [1, 2]. Альфа-ДН (HNP 1–4) содержатся в азурофильных гранулах нейтрофилов и обладают активностью против микроорганизмов представителей нормальной микрофлоры человека, например *E.coli*. Соответственно, количество дефензинов возрастает при инфекциях, и их определение имеет существенное клиническое значение. Образование сквозных дыр в клетке мишени основной механизм антимикробного действие АМП. Учитывая, что к каждому остатку N-ацетилмурамовой кислоты присоединен олигопептид (тетрапептид ), включающий несколько уникальных аминокислот, в т. ч. D-изомер аланина, пептидогликан может являться субстратом для определения активности ряда дефензинов [3,4].

**Целью** исследования стало изучение активности ферментов сыворотки крови по способности разрушать пептидогликан у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями.

**Материалы и методы.** Выделение пептидогликана (ПГ) из клеточной стенки грамотрицательных бактерий проводили по методике, предложенной Львовом В.Л., Пинегиным Б.В., Хаитовым Р.М. в нашей модификации. В качестве культуры использовали *E. coli* ATCC 25922. Полученный ПГ метили 2%м раствором Конго красного. Для постановки метода использовали пептидогликан, меченый 2% Конго красным (ПМК), сыворотку больного и буферный раствор (0,2 М солянокислый трис-буфер) с pH 7,4.Для исследования активности ферментов, разрушающих пептидогликан было взято 14 сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями, находившихся на лечении в отоларингологическом и офтальмологическом отделениях Витебской областной клинической больницы, и 32 сыворотки здоровых доноров. Пациенты были распределены по группам следующим образом: с рецидивирующим кератитом — 4 пациента, с хроническим гнойным отитом — 4 пациента, с ларингитом — 2, с вазомоторным ринитом — 1, с полинозным риносинуситом — 1, с хроническим паротитом — 1, с хроническим гнойным синуситом — 1 пациент.

Сыворотку крови перед применением центрифугировали 1,5 тыс. об/мин в течение 10 мин для осаждения взвешенных частиц.В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови. Во второй ряд эппендорфов — 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови, которую предварительно нагревалив течение часа при температуре 56°С для инактивации комплемента. Контролем служили пробы, содержащие трис-HCl буфер с pH 7,4 в количестве 300 мкл и 100 мкл сыворотки крови. Далее проводили инкубацию проб в термостате при t=37°С в течение 24 ч. После инкубации пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 7 мин (10 тыс. об/мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося неразрушенного ПМК. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при

длине волны 492 нм определяли оптическую плотность в лунках. Промежуточный результат выражался в оптических единицах и рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных. Для пересчета полученного результата в пикокаталы была использована формула, полученная после построения калибровочного графика по разведенному Конго красному, в котором была отражена зависимость активности фермента от оптической плотности раствора, исходя из того, что при расщеплении 1 молекулы субстрата, в раствор переходит 1 молекула конго-красного:

$$Y= [-0,001+0,026\times Еоп] \times 9,921,$$

где Y — искомый результат;

Еоп — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Так как анализ распределения данных показал их непараметрическое распределение, статистическую обработку проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова, отличия считались достоверными при $p<0,05$.

**Результаты и их обсуждения.** В результате исследования было выявлено, что у пациентов с гнойно-воспалительной инфекцией активность ферментов, способных разрушать ПГ достоверно ниже ($p<0,05$) в сравнении с донорами (соответственно 0,211±0,025 и 0,209±0,033 пкат).

При оценке активности ферментов, разрушающих ПГ было установлено, что после инактивации комплемента способность разрушать ПГ достоверно снижается (0,183±0,02 пкат. у лиц с гнойно-воспалительными заболеваниями и 0,205±0,108 пкат у доноров, $p<0,05$). Результаты исследований представлены в таблице.

Таблица — Активность ферментов, способных разрушать пептидогликан до и после инактивации комплемента у доноров и у пациентов с гнойно-воспалительной инфекцией

| Доноры, пкат | Доноры после инактивации комплемента, пкат | У пациентов с инфекцией, пкат | После инактивации комплемента у пациентов с инфекцией, пкат |
|---|---|---|---|
| Группа 1 | Группа 2 | Группа 3 | Группа 4 |
| n=14 | n=14 | n=32 | n=32 |
| 0,211±0,025 | 0,205±0,108 | 0,209±0,0330 | 0,183±0,02 |

Примечания:

1. Достоверные отличия, $p<0,05$ между группами 1 и 3; 2 и 4.
2. Недостоверные отличия, $p>0,05$ между группами 1 и 2; 3 и 4.

**Выводы:**

1. Разработана методика, позволяющая определять антимикробную активность сыворотки крови пациентов по ее способности разрушать пептидогликан, что возможно является одним из фактов неспецифической резистентности, позволяющей микроорганизмам бороться с инфекцией.

2. Установлено, что способность разрушать пептидогликан достоверно выше у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями ($p<0,05$), чем у доноров, не связана с активностью комплемента и возможно объясняется выбросом ряда дефензинов из гранул нейтрофилов.

3. На основании полученных данных предлагается использовать пептидогликан в клинико-диагностических лабораториях как субстрат для определения активности дефензинов, которые в свою очередь могут использоваться в качестве маркеров системной активации нейтрофилов.

**Литература**

1. Multifunctionalcations peptides of human defensins / A.S. Budikhina, B.V. Pinegin // Immunopathol., allergol., infectol. — 2008. — № 2. — P. 31–40.

2. Innovative concept of antimicrobial peptides as molecular factors of immunity / G.M. Aleshin, N. Kokryakov, O. Shamova // Acad. Med. J. — 2010. — № 4. — P. 149–160.

3. Пептидогликан [Электронный ресурс]. — Режим доступа:http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%B5%D0%BF%D1%82%D0%B8%D0%B4%D0%BE%D0%B3%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BD. — Дата доступа: 14.07.2013.

4. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. — М.: Мир, 1991. — Р. 133.

## ANALYSIS OF ENZYME ACTIVITY OF BLOOD SERUM FOR THE ABILITY TO DESTROY PEPTIDOGLYCAN IN PATIENTS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES

**Okulich V.K., Ziamko V.Y., Kiriluk O.D.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

14 sera from patients with purulent-inflammatory diseases, which were treated in otolaryngology and ophthalmology departments of Vitebsk District Clinical Hospital, and 32 sera from healthy donors were taken. The technique that allows determining antimicrobial activity of enzymes in blood serum for their ability to degrade peptidoglycan was developed. It was found, that enzyme ability to destroy peptidoglycan was significantly higher in patients with purulent-inflammatory diseases ($p<0.05$), than the one in donors.

**Keywords:** defensins, E. coli ATCC 25922, peptidoglycan.

Поступила 04.09.2013

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ-ИНДУКТОРОВ СОМАТИЧЕСКИХ ГИПЕРМУТАЦИЙ В СПЛЕНОЦИТАХ МЫШЕЙ ЛИНИИ CB57/BL, АМНИОТИЧЕСКОЙ И АЛЛАНТОИСНОЙ ЖИДКОСТИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

**Павлов К.И., Титов Л.П., Бутько Л.В.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** В работе представлена схема постановки индофенольной колориметрической реакции на 96-луночном планшете для учета активности ферментов-индукторов соматических гипермутаций в экспериментальных моделях мышей CB57/BL и куриных эмбрионов. Измерена активность ферментов в лизате спленоцитов мышей, амниотической и аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. Показана схема пробоподготовки, определены стандартные расчетные параметры реакции.

**Ключевые слова:** соматические гипермутации, семейство ферментов AID/Apobeck, индофенольная реакция, мыши CB57/BL, куриные эмбрионы.

**Введение.** Семейство высокогомологичных ферментов цитидиндезаминазы (AID/Apobeck dioxy-citydin deaminases family) — конечный эффектор в образовании соматических гипермутаций в генах вариабельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов. Непосредственный механизм активации цитидиндезаминазы включает определенный каскад последовательных ферментативных реакций: сперва специфический белок адаптер 14–3–3 присоединяется к повторяющимся мотивам 5`-AGCT-3` S-региона ДНК, далее 14-3-3 присоединяет AID и белок-PKA, который на следующем этапе фосфорилирует цитидиндезаминазу по серину в 38-м положении, за счет чего возникает сайт для присоединения RPA-белка, который повышает дезаминационную активность AID во много раз [14]. Нужно также учитывать, что AID-подобные ферменты функционируют во многих клетках организма, и процессы, происходящие при соматических гипермутациях, видимо, являются частным вариантом более общего процесса, связанного с репарацией ДНК и поддержанием транскрипционной стабильности [11]. Например, гиперактивация данной ферментной системы онкогенными вирусами может приводить к опухолевой трансформации клеток. Для лимфотропного вируса Эпштейна–Барр высокий уровень соматических гипермутаций является необходимым условием достаточной репликации [2]. Совокупно функциональную роль наиболее изученного гомолога семейства — фермента APOBECK 3G (а фактически и всего семейства цитидиндезаминазы) — можно представить концепцией «внутриклеточного центуриона» — центрального сенсора и эффектора при нарушениях стабильности окончательного редактирования продукта экспрессии генома клеток (рисунок 1) [4, 8].

Недостаточность функции ферментативных системы, индуцирующей соматические гипермутации, приводит, фактически, к иммунодефицитам различной степени выраженности. Можно предположить, что определенная часть неудач гуморального иммунного ответа при вакцинации (низкий/отсутствующий протективный титр) обусловлена, как раз, снижением числа соматических гипермутаций (Титов Л.П., 2010) и, следовательно, дефицитом высокоафинных антител [1]. Определенная связь с активностью соматического мутагенеза прослеживается и в ряде аутоиммунных заболева-

ний. Так, высок показатель соматических гипермутаций в клетках лимфобластоидных линий, продуцирующих ревматоидный фактор.

Среди методов изучения активности ферментов цитидиндезаминазы значительный удельный вес по-прежнему занимают биохимические спектрофотометрические и колориметрические тесты [2, 3, 5, 9, 10, 12, 13]. Колориметрическая методика (индофенольная колориметрическая реакция, где в качестве субстрата используются растворы нуклеозидов) удобна для одновременного исследования двух других диагностически значимых нуклеозидаз — аденозиндезаминазы и гуанозиндезаминазы [9, 10, 13]. Одновременный учет одновременной активности всех дезаминаз позволяет оценить источник поступления ферментов в биологическую жидкость и степень воспалительной реакции [13]. Спектрофотометрический метод измерения основан на сравнении, оптической плотности начального раствора цитидина и оптической плотности раствора после обработки ферментом. Образование урацила меняет оптическую плотность начального раствора. Данный метод хорош для хроматографически очищенных растворов ферментов, но плохо подходит для исследования активности фермента в окрашенных жидкостях. Длительное применение двух этих методик объясняется определенной «окончательностью» результатов: ни генотипирование (ПЦР, SNP), ни изучение количества транскрибируемого продукта методом ПЦР в реальном времени не отображают реальной функциональной активности фермента по отношению к субстрату. Интенсивная экспрессия гена цитидиндезаминазы не является доказательством высокой задействованности белкового продукта этого гена из-за наличия многих уровней контроля и участия в дезаминировании многочисленных сорегуляторов: (ss) DNA binding protein RPA, kinase DNA-PKcs, Protein Kinase A, белок адаптор 14-3-3, факторы транскрипции и процессинга мРНК, CTNNBL1, PTBP2, SRSF1, РНК-экзосома субъединица 15, Spt5, Spt6, RNA polymerase II, RNA Pol-II associated factor 1 (PAF1), EXPO1/Crm1, Hsp90, Hsp40 DnaJa1, MDM2, eEF1A, REGg, KAP1/Trim28, Germinal centre-associated nuclear protein (GANP), белки-гистоны и др. Таким образом, единственная достоверная возможность учета регуляции цитидиндезаминазы возможна по конечному содержанию самого фермента в исследуемом образце [8].

Рисунок 1 — Функции ферментов семейства AID/Apobeck dioxy-citydin deaminases family

**Цель** исследования: определение параметров колориметрического учета активности цитидиндезаминазы на основе перспективных в смысле возможного ответа экспериментальных моделей мышей линии CB57/BL и куриных эмбрионов.

**Материалы и методы.** Получение плазмы и клеточной суспензии у мышей (рисунок 2): мыши линии C57BL/6, n=10; соотношение самцов и самок — 50/50; масса — 30–35 г; средний возраст —

9 мес.; эвтаназия — ингаляция углекислого газа (в соответствии с рекомендациями Американской Ассоциации ветеринаров). Забор крови посредством кардиальной пункции на бьющемся сердце с предварительным вскрытием грудной клетки. Забор селезенки: орган помещался в культуральную среду DPMEM при температуре 37°С. Селезенка разрезалась на 5–6 фрагментов хирургическими ножницами, далее паренхима вылущивалась инъекционными иглами и глазным пинцетом. Клетки подсчитывались в счетной камере с сеткой Горяева и далее разводились средой до 10–12 млн клеток в 1 мл среды, которую добавляли в Эппендорф 1,5 мл. Дезинтеграция клеток проводилась стандартным методом троекратного замораживания-оттаивания (-25°С–37°С). Морфологически спленоциты изучались с помощью окраски по Романовскому–Гимзе. Контроль получаемой клеточной суспензии производился на проточном цитофлуориметретре FACSCalibur (Becton Dickinson). Исследовались параметры прямого и обратного светорассеяния. Жизнеспособность клеток оценивалась по инкорпарации пропидия йодида и параллельно морфологически по инкорпорации красителя Трипанового синего.

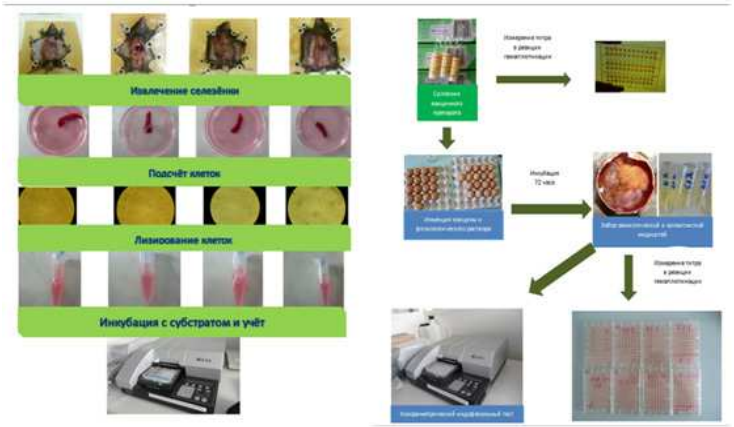



Рисунок 2 — Схема экспериментальных моделей исследования цитидиндезаминазы

***Куриные эмбрионы (рисунок 2).*** Были использованы 11-дневные куриные эмбрионы циплят-бройлеров (птицефабрика «Дубовляны»). Схема заражения: 17 эмбрионов были заражены 0,2 мл разведенного в физиологическом растворе леофилизата содержащего не менее 1/8 от разовой дозы вакцины Ультравак (НПО ФГУП «Микроген», Россия) сезона 2012/13 гг. для интроназального введения, содержащая живые леофилизированые вирусы А/Калифорния/7/2009(H1N1)пдм09, А/Виктория/361/2011(H3N2), В/Висконсин/1/2010 в количестве не менее 106,9 ЭИД50 каждого вируса (0,125×06,9 ЭИД50 ). Физиологический раствор в том же объеме был введен 17-ти эмбрионам. Отверстия от инъекции парафинизировались. Препараты вводились в аллантоисную полость. Инкубация составила 72 ч при 37°С. После окончания инкубации эмбрионы помещались на 60 мин в холодильную камеру для предотвращения растекания крови при вскрытии. Сперва вскрывалась воздушная камера, далее пинцетом разрывалась оболочка воздушной камеры и аллантоисная оболочка, производился забор аллантоисной жидкости пипеткой-дозатором. Оставшаяся аллантоисная жидкость удалялась. Далее при необходимости отверстие в скорлупе расширялось, вскрывалась амниотическая полость и забиралась амниотическая жидкость. Оценивался габитус и степень развития эмбриона. Полученный материал замораживался в морозильной камере на 24 ч. После размораживания аллантоисная и амниотическая жидкости осветлялись центрифугированием 1 мин при 5000 об/мин.

***Индофенольный тест.*** Концентрации используемых реагентов использованы как ранее описано в работах [2, 3] со следующими изменениями: концентрация субстратных растворов была снижена в два раза, до 10,5 мМоль/л; содержание катализатора нитропруссида в фенольно-нитропруссидном растворе в 4 раза выше (200 мкг/л).Реакция проводилась в плоскодонном 96-луночном планшете со следующим соотношением реакционных компонентов: 60 мкл субстрата, 30 мкл исследуемой жидкости для экспериментальной модели мышей и 10 мкл — для экспериментальной модели эмбрионов: 90 мкл фенольно-нитропруссидного раствора: 90 мкл основного раствора гиппохлорита натрия. Стандартный раствор и буфер для контроля реагентов брались в объеме 90 мкл. Измерение проводилось на иммуноферментном анализаторе Biotek Eb 800 при длине

волны 630 нм. Для расчета активности фермента использована формула Giusti G., Galanti B., 1984 и Pedersen R., Berry A., 1977 [2, 3].

***Статистическое исследование.*** Обработку полученных данных проводили при помощи программ STATISTICA 10 for Windows и Microsoft Exel. Для характеристики значения активности цитидиндезаминазы использованы методы описательной статистики. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05. При оценке параметров оптической плотности растворов стандарта сульфата аммония, контроля реагентов и раствора цитидина рассчитывалось среднее гармоническое значение.

**Результаты и их обсуждение.** ***Жизнеспособность спленоцитов***. При оценке инкорпорации пропидия йодида на проточном цитофлуориметре и подсчете окрашенных трипановым синим клеток, число мертвых клеток составило 20–30% суспензии, что соответствовует литературным данным по выделению мышиных спленоцитов.

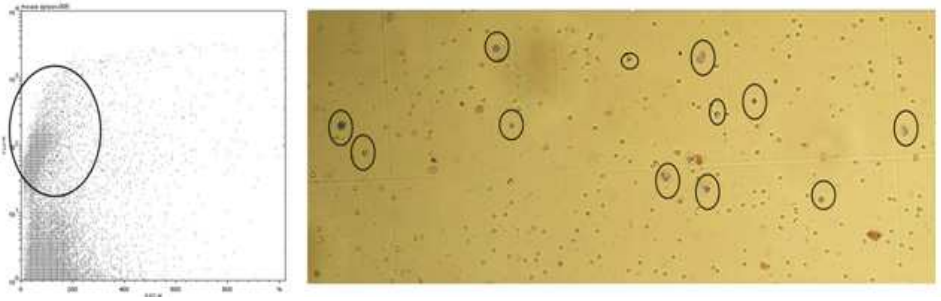
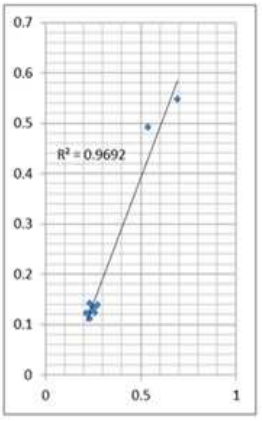


Рисунок 3 — Параллельное исследование жизнеспособности клеток по инкорпарации пропидия йодида по окраске Трипановым синим

***Исходный аммиак лизата спленоцитов и плазмы.*** Средний уровень активности цитидиндезаминазы в лизате клеток 1,70±0,97 МЕ/л. Разность оптической плотности образца и контроля образца и показывает долю аммиака, образовавшегося в результате ферментативной дезаминации в общем количестве образовавшегося индофенола. Как видно из анализа корелляции между показателями контроля реагентов в пробах и уровнями измеренного остаточного аммиака, именно аммиак лизата клеток является основной составляющей повышения оптической плотности в контроле реагентов, а значит разность оптических плотностей обусловлена именно дезаминацией цитидина (таблица 1).

Таблица 1 — Оптическая плотность (А) и значение активности цитидиндезаминазы лизата клеток исследуемой группе с исследованием корелляции значений контроля реагентов и изначального азота образца

| Исследуемая группа | Инкубация с опытным образцом, А | Инкубация с контролем реагентов, А | Удельный вес дезаминазной активности | Активность цитидин-дезаминазы МЕ/л | Исходное содержание аммиака, А |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.659 | 0.693 | -0.034 | -0.993 | 0.548 |
| 2 | 0.58 | 0.537 | 0.043 | 1.256 | 0.492 |
| 3 | 0.246 | 0.244 | 0.002 | 0.058 | 0.137 |
| 4 | 0.268 | 0.231 | 0.037 | 1.081 | 0.124 |
| 5 | 0.342 | 0.272 | 0.070 | 2.045 | 0.138 |
| 6 | 0.323 | 0.234 | 0.089 | 2.600 | 0.111 |
| 7 | 0.376 | 0.216 | 0.160 | 4.674 | 0.122 |
| 8 | 0.341 | 0.254 | 0.087 | 2.541 | 0.132 |
| 9 | 0.346 | 0.258 | 0.088 | 2.570 | 0.123 |
| 10 | 0.271 | 0.231 | 0.040 | 1.168 | 0.141 |
| **СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ** | **0.375±0.085** | **0.317±0.100** | **0.058±0.033** | **1.700±0.970** | **0.207±0.103** |
| СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ | 0.136 | 0.162 | 0.054 | 1.565 | 0.166 |
| СРЕДНЯЯ ОШИБКА РЕПРЕЗЕНТАТИВНОСТИ± | 0.043 | 0.051 | 0.017 | 0.495 | 0.052 |



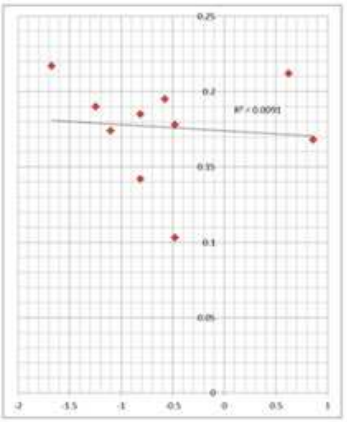

В соответствии с рассч етным значением доверительного интервала для данной выборки (±0,97 МЕ/л), как максимальное, так и минимальное значение дают результат, который можно интерпретировать как положительный. Корелляция между активностью фермента и оптической плотностью исходного аммиака хотя и имеет положительное значение (R=0,57), но ее невысокое значе-

ние позволяет также говорить, что разность оптических плотностей образца и контроля вызвана именно ферментативной дезаминацией.

Параллельное исследование плазмы (таблица 2) выявило отрицательные результаты, причем значения контроля реагентов, а следовательно и остаточный аммиак, незначительно отразились на итоговой активности. Погрешность в исследования мог бы внести аммиак от спонтанной дезаминации самого цитидина, тем более, что в растворе при переменах температуры и pH он менее стабилен, чем чистый цитидин.

Таблица 2 — Оптическая плотность (А) и значение активности цитидиндезаминазы в плазме крови исследуемой группы с исследованием корелляции значений контроля реагентов и активности фермент

| Исследуемая группа | Инкубация с опытным образцом, А | Инкубация с контролем реагентов, А | Удельный вес дезаминазной активности | Активность цитидин-дезаминазы МЕ/л |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.182 | 0.217 | -0.035 | -1.68 |
| 2 | 0.125 | 0.142 | -0.017 | -0.81 |
| 3 | 0.093 | 0.103 | -0.01 | -0.48 |
| 4 | 0.151 | 0.174 | -0.023 | -1.10 |
| 5 | 0.225 | 0.212 | 0.013 | 0.62 |
| 6 | 0.164 | 0.19 | -0.026 | -1.24 |
| 7 | 0.183 | 0.195 | -0.012 | -0.57 |
| 8 | 0.168 | 0.185 | -0.017 | -0.81 |
| 9 | 0.186 | 0.168 | 0.018 | 0.86 |
| 10 | 0.168 | 0.178 | -0.01 | -0.48 |
| **СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ** | **0.165±0.022** | **0.176±0.021** | **-0.012±0.010** | **-0.570±0.487** |
| СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ | 0.036 | 0.034 | 0.016 | 0.786 |
| СРЕДНЯЯ ОШИБКА РЕПРЕЗЕНТАТИВНОСТИ | 0.011 | 0.011 | 0.005 | 0.249 |



***Куриные эмбрионы.*** Цитозин в качестве субстрата был использован для контроля специфичности цитидиндезаминазы. У цыплят, мышей и людей биодеградация цитозина не отмечается. Если рассматривать те эмбрионы, в которые вводился стерильный физиологический раствор, как потенциальный вариант нормы, можно сравнить активность дезаминаз в аллантоисной и амниотической жидкостях. Если принять все отрицательные результаты за отсутствие активности, то явно заметно повышение уровня активности цитидиндезаминазы и, особенно, аденозиндезаминазы в аллантоисной жидкости в сравнении с амниотической. Объяснить это можно тем, что в аллантоисную жидкость идет экскреция метаболитов и продуктов клеточного лизиса, амниотическая же жидкость, как среда, непосредственно окружающая зародыш, очищается от продуктов апоптоза и некроза клеток. Аллантоисная жидкость опять-таки биохимически намного активнее амниотической. То, что уровень «активности» в отношении цитозина выше, чем для цитидина, и составляет около 10 МЕ/л может быть результатом спонтанной дезаминации цитозина, которая в норме идет довольно активно при комнатной температуре и увеличивается с течением хранения растворов. В целом в аллантоисной полости, куда и проводилось заражение, максимальная активность нуклеозидаз не превысила 20 МЕ/л. Если теперь оценить влияние заражения вируссодержащим материалом на активность ферментов для аллантоисной жидкости отдельно, то можно выделить только появление гуанидиндезаминазной активности после заражения трехкомпонентной вакциной.

Амниотическая жидкость сохраняет биохимическую инертность при введении вируссодержащего материала. Выделяется только колебание активности по гуанозину, причем в сторону уменьшения. В целом можно отметить определ енную биохимическую инертность амниотической жидкости в сравнении с аллантоисной. Взаимосвязь активностей в аллантоисной и амниотической жидкостях не была отмечена ни для одного из исследуемых ферментов, причем как при введении физиологического раствора, так и при введении вакцины (рисунок 5). Однако, в аллантоисной жидкости прослеживалась зависимость в колебании активностей между цитидиндезаминазой и аденозиндезаминазой, причем как в норме (R=0,72) так и при введении вакцинальных вирусов (R=0,70).

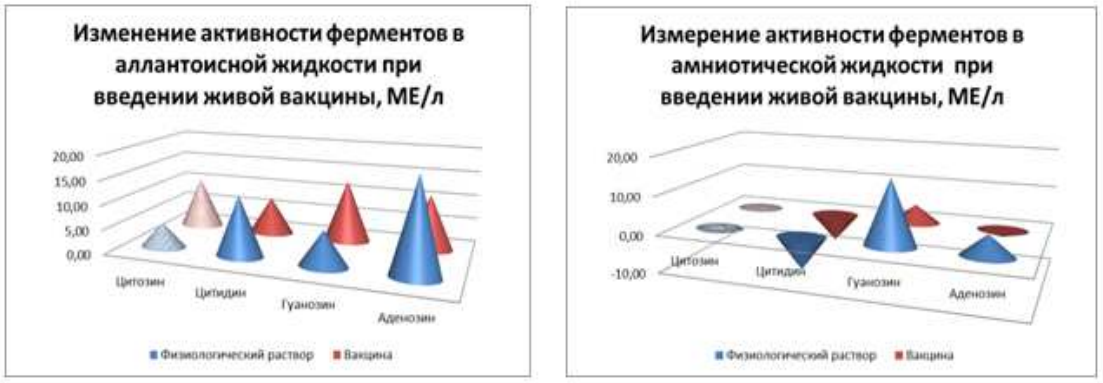



Рисунок 4 — Сравнение активности ферментов нуклеозидаз аллантоисной и амниотической жидкостях куриного эмбриона

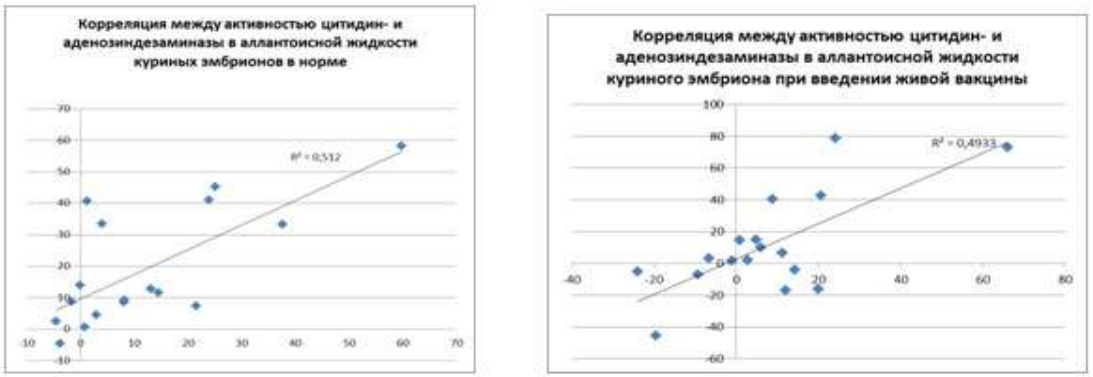



Рисунок 5 — Корреляция между цитидин- и аденозиндезаминазами в норме и при введении вакцины

***Стандартизация параметров для постановки реакции дезаминации на 96-луночном планшете.*** Для характеристики дезаминационной способности исследуемых образцов, уровня остаточного аммиака, способности образца к поглащению аммиака необходимо стандартизировать показатели концентрации аммиака (и, следовательно, индофенола). Нужно определить допустимую границу оптической плотности контроля реагентов и объем аммиака, образующийся в растворе цитидина при его хранении, инкубации и контакте с фенольно-нитропруссидным и гиппохлоридным реагентами.

При титровании основного раствора сульфата аммония динамика нарастания оптической плотности и ее максимальные значения не всегда имеют линейный характер (рисунок 6).

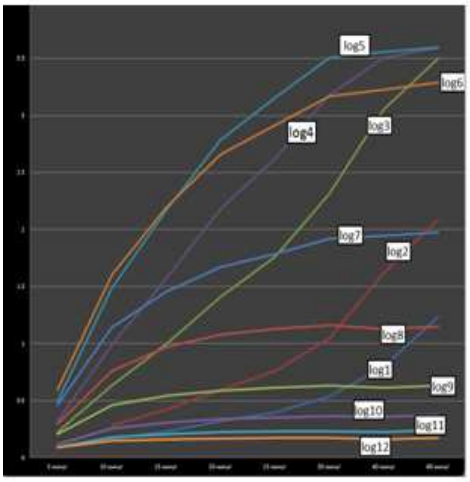



Рисунок 6 — Динамика нарастания оптической плотности и ее максимальные значения в последовательных разведениях основного раствора сульфата аммония

Так, разведения сульфата аммония соответстующие основному раствору (15 ммоль/л)-log1 и двукратному его разведению-log2 характеризуются куда более низким конечным уровнем индофенола и низкой кривизной динамики его нарастания, чем последующие разведения (log3-log9). Разведение log9 соответствует стандартному раствору сульфата аммония, относительно которого и вед ется рассчет. Максимальные разведения (log11–12) теряют кривизну нарастания динамики и по своим значениям сливаются с контролем реагентов. Основной массив разведений log3–log9 (которому и соответствует основная масса получаемых значений) по динамике нарастания титра пропорционален концентрации сульфата аммония.

В таблице 3 показаны основные средние значения рассч етных величин для использованных в работе объемов реакционной смеси (90 мкл стандарта сульфата аммония, 60 мкл расствора цитидина, 90 мкл буферного, 90 мкл фенольно-нитропруссидного и 90 мкл щелочного раствора гипохлорита). Рассчитана также средняя гармоническая величина, используемая часто для задания физиологических констант.

Таблица 3 — Стандартизация параметров для постановки реакции дезаминации на 96-луночном планшете

| Показатели | Стандарт сульфата аммония, А | Контроль реагентов, А | Раствор цитидина, А |
|---|---|---|---|
| Число исследований, n | 196 | 192 | 50 |
| Среднее арифметическое | 0.532±0.014 | 0.151±0.009 | 0.340±0.011 |
| Среднее гармоническое | 0.511 | 0.123 | 0.331 |
| Стандартное отклонение | 0.100 | 0.062 | 0.039 |

Полученные для экспериментальной модели мышей и куриных эмбрионов результаты активности цитидиндезаминазы соответствуют предыдущим результатам по исследованию активности, выделению и очистке цитидиндезаминазы. После хроматографической очистки белков *Escherichia coli* и концентрировании в 1690 раз активность была в 118 ед/мг. При выделении фермента из человеческой плаценты добились высокой степени концентрирования (46000 раз), но финальная активность была не самой высокой (64,1 ед/мг). Активность аденозиндезаминазы у пациентов при туберкулезном плеврите колориметрически хорошо различима как в плазме, так и в плевральной жидкости, тогда как нормальная активность может не превышать 6 МЕ/л [13]. Нужно отметить также, что несмотря на функциональную схожесть и генетическую гомологичность цитидиндезаминазы у очень широкого круга микроорганизмов [9] при сравнении этих данных речь идет только о сравнении максимальных величин, достичь которых удалось за счет очистки, концентрирования, стимуляции фермента, но не о прямом сопоставлении результатов [5, 12, 13]. К тому же, активность фермента AID относительно одиночного цитидина не может быть эквивалентной активности в отношении двуцепочечной ДНК вариабельных участков генов тяжелых цепей иммуноглобулинов или репарируемой ДНК, где имеется регуляция целой группой ко-модуляторов [8].

Касательно относительно высоких значений цитидиндезаминазы в амниотической и аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, следует отметить, что при всех возможных погрешностях измерения, общая тенденция говорит о том, что на 14-й день развития в норме и аллантоисная и амниотическая жидкости не содержат значительных концентраций дезаминаз. Аллантоисная жидкость все-таки биохимически более активна и может рассматриваться как внутренняя среда куриного эмбриона [6, 7]. Основная причина видится в том, что аллантоисная жидкость представляет «периферию» зародышевых оболочек, куда идет утилизация продуктов метаболизма как самого зародыша, так и всех его оболочек. К тому же, к 14-м сут развития эмбрион уже достаточно сформирован и процессы кроветворения переместились из желточного мешка в тело зародыша.

Таким образом, остаются открытыми следующие вопросы:

1. Каким должно быть отношение объемов исследуемого образца и субстратного раствора нуклеозида: порядка 1:1 [9, 12], или порядка 1:10 [2, 3].

2. Чем объясняется снижение содержания раствор енного аммиака при добавлении исследуемых проб плазмы и лизата клеток и как избежать отрицательных результатов «активности» фермента.

3. Какова потеря ферментативной активности в результате процедуры замораживания-оттаивания при дезагригации клеточной суспензии.

**Выводы:**

1. Активность цитидиндезаминазы у мышей C57BL/6 определяется внутриклеточно (1,7 МЕ/л±0,97) и не определяется в плазме.

2. Значение показателя контроля реагентов в индофенольной колориметрической реакции при измерении внутриклеточной активности цитидиндезаминазы определяется в основном изначальным содержанием аммиака в пробе.

3. Активность ферментов аденозиндезаминазы и цитидиндезаминазы в норме в аллантоисной жидкости 14-дневного куриного эмбриона незначительно выше, чем в амниотической.

4. При отсутствии на выходе гемагглютинирующей активности введение в аллантоисную полость живой леофилизированной противогриппозной вакцины не приводит к значительному колебанию ферментов нуклеозид — дезаминаз как в аллантоисной, так и в амниотической жидкостях.

5. Между уровнями активности цитидиндезаминазы и аденозиндезаминазы в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов существует взаимосвязь как в норме, так и при введении живой гриппозной вакцины.

6. Повышение оптической плотности при повышении концентрации аммиака стандартного раствора идет линейно в диапазоне с третьего по девятое двукратное разведение основного раствора.

**Литература**


1. Титов, Л.П. Компьютерная иммунология: сравнительный анализ нуклеотидных замен в CDR и FR фргментах в VH генах иммуноглобулинов при гепатите С, криоглобулинемии и лейкозах / Л.П. Титов, Т.А. Столярова, Е.А. Столярова // Вести НАН РБ. Мед. серия. — 2010. — № 3. — С. 10–18.

2. Янович, О.О. Активность аденозиндезаминазы крови при инфекционном мононуклеозе / О.О. Янович, Л.П. Титов, В.В. Щерба // Здравоохранение. — 2012. — № 12. — С. 17–19.

3. Способ диагностики плеврита туберкулезной этиологии на основании определения активности аденозиндезаминазы в сыворотке крови и в плевральной жидкости / А.Д. Таганович [и др.] // Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний / РНМБ. — Минск, 2008.

4. Chiu, Ya-Lin APOBEC3G: an intracellular centurion / Ya-Lin Chiu, C.G. Warner // Phil. Trans. R. Soc. B. — 2009. — Vol. 364. — P. 689–703.

5. Ellis, G. Colorimetric determination of serum acid phosphatase activity using adenosine 3'-monophosphate as substrate / G. Ellis, A. Belfield, D.M. Goldberg // J. Clin. Pathol. — 1971. — Vol. 24. — P. 493-500.

6. Gas-permeable ethylene bags for the small scale cultivation of highly pathogenic avian influenza H5N1 and other viruses in embryonated chicken eggs / S.B. Hamilton [et al.] // Virol. J. — 2010. — Vol. 7. — P. 23.

7. Ito, T. Differences in Sialic Acid-Galactose Linkages in the Chicken Egg Amnion and Allantois Influence Human Influenza Virus Receptor Specificity and Variant Selection / T. Ito // J. Virol. — Vol. 71, № 4. — P. 3357–3362.

8. Kumar, S.S. GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy / S.S. Kumar // Nature Commun. — 2013.— Vol. 4. — P. 1830.

9. Osborne, W.R.A The metabolism of deoxyguanosine and guanosine in human B and T lymphoblasts. A role for deoxyguanosine kinase activity in the selective T-celi defect associated with purine nucleoside phosphorylase deficiency / W.R.A. Osborne, C.R. Scott // Biochem. J. — 1983. — Vol. 214. — P. 711–718.

10. Pedersen, R.C. Sensitive, Optimized Assay for Serum AMP Deaminase / R.C. Pedersen, A. Berry // J. Clin. Chem. — 1977. — Vol. 23, № 9. — P. 1726–1733.

11. Randau, L. Cytidine Deaminase Edits C to U in Transfer RNAs in Archaea / L. Randau // Science. — 2009. — Vol. 324. — P. 657–659.

12. Circadian rhythm of serum cytidine deaminase in patients with rheumatoid arthritis during rest and exercise / P.W. Thompson [et al.] // Ann. Rheumatic Dis. — 1989. — Vol. 48. — P. 502–504.

13. Valdés, L. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy / L. Valdés // Eur. Respir. J. — 1996. — Vol. 9. — P. 747–751.

14. Zan, H. Regulation of Aicda expression and AID activity / H. Zan, P. Casali // Autoimmunity/ — 2013. — Vol. 46, № 2. — P. 81–99.


## ACTIVITY OF ENZYMES INDUCTORS OF SOMATIC HYPER MUTATIONS IN SPLENOCYTES OF MICE OF THE CB57/BL LINE, AMNIOTIC AND ALLANTOISNY LIQUID OF CHICKEN EMBRYOS


**Pavlov K.I., Titov L.P., Butko L.V.**

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



In the article was explained methodic for AID/Apobeck-somatic hypermutation inductors indophenolic colorimetric determination in 96-wells immunologic microplates. Were measured intracellular

AID activity for mice CB57/BL spleen cells, chicken embryonated eggs amniotic and allantois' fluids. We proposed definite measurement parameters for ammonia and reagent test determination and citydine solution ammonia background .

**Keywords:** somatic hypermutation, AID/Apobeck dioxy-citydin deaminases family, indophenolic colorimetric reaction, CB57/BL mice, chicken embryonated eggs.

Поступила 04.09.2013

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КУЛЬТУРОЙ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ПРАЙМИРОВАНИИ И СОЗРЕВАНИИ МЕТОДОМ ДНК-МАТРИЦЫ

**Титов Л.П., Гончаров А.Е., Левченя М.В., Спринджук М.В.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Дендритные клетки в силу своей полифункциональности участвуют во многих иммунобиологических процессах, обеспечивают механизмы как естественного, так и адаптивного иммунитета. Участие в инициации и регуляции адаптивного иммунного ответа дендритных клеток эволюционно более позднее приобретение, повреждаемое факторами биологической (вирусами, бактериями, простейшими) и иной природы. Ученые разных специальностей проявляют широкий интерес к дендритным клеткам из-за возможностей применения их культур, полученных *ex vivo*, в клинической практике. Вместе с тем клинический успех применения дендритных клеток ограничен из-за недостаточной изученности фундаментальных основ функционирования генома этих клеток на разных стадиях развития, созревания, участия в иммунологических процессах. Изучение транскриптома дендритных клеток и разработка направленной эпигеномной регуляции экспрессии генов представляется приоритетным научным направлением. В работе использованы классические подходы выделения и культивирования костномозговых миелоидных дендритных клеток (CD34+) для целей иммунотерапии пациентов с множественной резистентным туберкулезом. Изучение экспрессии генов иммунной системы проведено с помощью разработанного ДНК-микрочипа. Полученные данные проанализированы современными методами биоинформатики. Идентифицированы группы генов ДК дифференцированно изменивших экспрессию генов процессе праймирования и созревания, определение которых возможно использовать в качестве маркеров зрелости культур клеток, а также в научных целях.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, созревание, ДНК-микрочип, транскриптом ДК, эпигеномная регуляция.

**Введение.** Дендритные клетки — эволюционная сформировавшаяся линия лейкоцитов, выполняющая ведущую роль в неспецифической защите организма и, что особенно важно, в инициации и поддержании специфического иммунного ответа [1]. Существование данного типа клеток иммунной системы, их морфологических особенностей и функциональной роли открыто R.M. Steinman и Z.A. Cohn в 1973 г. [2], равно как и термин «дендритные клетки — ДК», хотя их тканевая форма в коже впервые описана П. Лангергансом более 100 лет назад [3]. Незрелые ДК так названы из-за их морфологии, так как они образуют множество отростков (дендритов) или «вуалевидных» выпячиваний (вуалевидные клетки). Предшественники ДК идентифицированы в костном мозге, как CD34+ экспрессирующие лейкоциты, и получили название общего предшественника дендритных клеток (ОПДК). Процесс дифференцировки ОПДК контролируется лигандом цитокина Flt3 (Flt3L) и его рецептором Flt3 (4 Belz GT) и транскрипционными факторами (PU.1, 1RF8 и E2.2), которые необходимы для прохождения отдельных стадий дифференцировки и формирования субпопуляций со специфическими функциями [4].

Морфологически ДК — популяция отростчатых прилипающих лейкоцитарных клеток, присутствующих в периферической крови (0,5–1,2% мононуклеарных лейкоцитов) и в следовых количествах во всех органах. Наиболее богаты ими вторичные лимфоидные органы — селезенка, лимфатические узлы. В количественном содержании и функциональной активности ДК при физиологических и патологических состояниях имеются существенные вариации. Имеется несколько типов ДК: клетки Лангерганса кожи, интердигитальные клетки лимфатических узлов, фолликулярные

клетки, лимфоидные (лимфопоэтические), миелоидные (моноцитопоэтические) и плазмацитоидные. Прекурсоры ДК из костного мозга мигрируют в периферическую кровь, циркулируют и под влиянием чужеродных субстанций и хемоаттрактантов накапливаются в лимфоидных органах — селезенке, лимфатических узлах, лимфоидных образованиях слизистых и кожи. Продолжительность жизненного цикла ДК зависит от их типа, клеточного и молекулярного микроокружения и составляет от нескольких дней до недели [4]. При патологических процессах гибель ДК в результате апоптоза или повреждения микробами возрастает, а образование новых клеток и их созревание замедляются.

В периферической крови на основании экспрессии поверхностных маркеров различают две основные субпопуляции ДК — CD11c+ CD123lower+ или миелоидные ДК(мДК) и CD123+CD11c- или плазмацитоидные ДК(пДК). Эти субпопуляции различаются и спектром других экспрессируемых поверхностных и секретируемых молекул, а также функциям. мДК экспрессируют молекулы CD33, CD45RO, HLA-DR, CD40 и CD86+, молекулы CD205, CD209, TLR 1, 2, 3, 4 и эффективны в захвате, процессировании и презентации чужеродных антигенов. Вследствие распознавания микробных факторов мембранными Toll-like рецепторами они продуцируют ФНО-а, а их зрелые формы — интерлейкин 12, который связываясь с рецепторами наивных Т-клеток через JAK-STAT сигнальные пути активирует CD4+ Т-клетки Th1 типа и продукцию ими цитокинов — ФНО-бета (лимфотоксина) и гамма-интерферона [5]. В противоположность этому пДК, составляющие 0,2–0,8% мононуклеаров крови слабо экспрессируют CD13, экспрессируют CD123, TLR-7 и TLR-9. Они менее эффективны в процессировании и презентации антигенов, но продуцируют значительные количества интерферонов 1-го типа (α,β,ω), которые под воздействием вирусов и ИЛ-3 инициируют иммунный ответ Т-лимфоцитов — Th1 и/или Th2 типа. ИЛ-3 поддерживает их дифференциацию в зрелые ДК и потенциирует активацию других типов Т-клеток [6].

В соответствии с широко признанной концепцией дихотомии регуляторных CD4+ Т-лимфоцитов на Th1 и Th2 накапливается все больше информации о функциональном разделении миелоидных ДК также на две субпопуляции: а) презентирующих антигены и стимулирующих CD4+ Т-лимфоциты Th1(мДК1); б) презентирующих антигены CD4+ Т-лимфоцитам Th2 (мДК2). Первая популяция может быть получена при культивировании моноцитов в присутствии колониестимулирующего фактора для гранулоцитов и макрофагов и ИЛ-4, а вторая — культивированием моноцитов в присутствии ИЛ-3, ИЛ-4 [5]. Начиная с 2000 г. появилось множество исследований посвященных разработке протоколов получения зрелых ДК, пригодных для проведения иммунотерапии пациентам с целью восстановления функционирования Т- и В- системы иммунитета, иммунологического надзора за репродукцией внутриклеточных патогенов и опухолевых клеток, антигенным гомеостазом и аутоиммунным ответом и аллергией [7–10].

Вместе с тем недостаточная изученность общих закономерностей функционирования генома ДК (формирование транскриптома, количественной модуляции экспрессии генов, связи с физиологическими процессами в норме и при патологии) сдерживает разработку способов и препаратов лекарственной регуляции генов с целью нормализации функционирования ДК, репрограммирования и реконструкции иммунного ответа, восстановления индивидуального протективного иммунитета [11–13].

**Цель** исследования: идентификация дифференцированно экспрессируемых генов культурой миелоидных дендритных клеток методом ДНК-матрицы (ДНК-чипов, микроаррэй) в процессе праймирования и созревания.

**Материалы и методы.** ***Пациенты.*** Костный мозг был получен от пациентов с множественно резистентным туберкулезом легких, проходившим курс иммунотерапии вакциной на основе зрелых дендритных клеток, праймированных антигенами микобактерий.

***Получение культур незрелых дендритных клеток.*** Мононуклеары выделяли центрифугированием образца костного мозга на градиенте плотности фиколл-пака. Из полученной взвеси мононуклеаров выделяли CB34+ клетки методом иммуномагнитной сепарации. Выделенные стволовые клетки культивировали на протяжении 10–12 сут для экспансии в питательной среде AIM-V, содержащей смесь цитокинов: Flt3L, CSF, IL-3 и IL-6. Затем с целью дифференцировки стволовых клеток и клеток-предшественников в ДК меняли предыдущую смесь цитокинов на: CSF-GM, IL-4 и TNF-a, клетки дополнительно культивировали 10 суток.

***Праймирование ДК и индукция их созревания.*** Для праймирования ДК культивировали на протяжении 6 ч в питательной среде с 10 мкг/мл короткоцепочечного пептида протеина микобакте-

рий туберкулеза — CFP-10. Затем ДК отмывали двукратно от пептида и культивировали при 37°С в увлажненной атмосфере с 5% $CO_2$ в течение 1 сут в среде, содержащей 25 нг/мл ГМ-КСФ, ФНО-а и дб-цАМФ (10-6М) в качестве индуктора созревания.

***Выделение суммарной РНК.*** Экстракцию общей РНК из ДК проводили раствором «Tri-Reagent» (раствор гуанидинтиоционата на феноле) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Определяли концентрацию РНК на фотометре.

***Получение комплементарной ДНК (кДНК).*** С этой целью использовали набор «SuperScript Plus Direct cDNA Labeling System», который позволяет получить меченную флуорохромами кДНК из РНК и очистить ее. Отжиг праймеров: а) подготовка реакционной смеси № 1 (15 мкл), состоящей из 10 мкл общей РНК, 1 мкл 10 мМ dNTP смеси, 2 мкл Anchored Oligo (dT) праймеров (2,5 мкг/мл), 2 мкл деионизированной воды. Отжиг праймеров проводили в термостате при температуре 70°С на протяжении 10 мин; б) приготовление реакционной смеси № 2: 6 мкл 5×буфера, 3 мкл 10× смеси нуклеотидов (Alexa Fluor 555-aha-dUTP) или (Alexa Fluor 647-aha-dUTP), 2 мкл 0,1М DTT, 1 мкл (40 ЕД) RNase OUT, 2 мкл (200 ЕД) обратной транскриптазы Superscript III. Смешивали реакционные смеси № 1 и № 2 на льду. Для проведения обратной транскрипции смеси проб помещали в амплификатор (термостат) с температурой 46°С на 3 ч. После окончания реакции остаточную мРНК инактивировали 0,1М раствором гидроксида натрия при температуре 70°С в течение 10 с и нейтрализовали 0,1М раствором соляной кислоты. Очистку кДНК от несвязавшихся нуклеотидов, неорганических солей и прочих примесей проводили при помощи колонок «Low Elution cDNA», затем кДНК растворяли в 20 мкл $dH_2O$.

***Дизайн иммунобиочипа.*** Иммунобиочип, содержащий ДНК олигонуклеотиды 652 специфических фрагментов генов иммунной системы, включая основные кластеры поверхностных рецепторов, проводящих сигнальных путей, ядерных факторов транскрипции, хемокинов, цитокинов, ростовых факторов, белков комплемента и белков клеточного цикла был разработан нами совместно с компанией ArrayIT(USA). Иммуночип содержит по два спота для каждого гена с фиксированными специфичными фрагментами ДНК-олигонуклеотидов.

***Гибридизация.*** 5 мкл синтезированной меченной кДНК денатурировали в 10 мкл гибридизационного буфера (ArrayIT, США) и наносили на реакционную зону биочипа. Биочип помещали во влажную гибридизационную камеру ArrayIT (Калифорния, США) на 6 ч при температуре 42°С. После инкубации слайды отмывали и высушивали.

***Сканирование и учет данных микроаррэй.*** Сканирование биочипов проводили с помощью «Innoscan 700A» при разрешении 3 мкм/пиксель в следующем режиме: а) канал Cy3 (зеленый лазер, 532 нм, усиление 30–45%, мощность – «low»; б) канал Cy5 (красный лазер, 635 нм), усиление 60–75%, мощность – «high». Интенсивность флюоресценции спотов оценивали, используя программу Mappix v.4.5.4. Осуществляли нормализацию полученных значений интенсивности флуоресценции средствами программы и сохраняли данные для последующей статистической обработки.

***Статистический анализ данных.*** Для обработки данных применялось программное обеспечение StatsDirect (http://www.statsdirect.com/), Minitab_16 (http://www.minitab.com/en-US/default.aspx?langType=1033) и Expander (http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/). Для оценки экспрессии генов использовали медианные значения интенсивности флуоресценции спотов и фоновой флуоресценции, а также кратность изменения экспрессии генов — повышение или снижение (up and down regulation). Для определения выраженности экспресс-сии генов мы выбрали общеизвестный двух выборочный t-тест Стьюдента с пороговым значением отбора пар генов $P<0.05$. Алгоритм этой математической операции был реализован в программе Expander на языке Java.

**Результаты и их обсуждение.** Использование ДНК микрочипов для оценки экспрессии генов определенными типами клеток или смешанной общей популяции и установления их связи с определенными физиологическими или патологическими состояниями базируется на центральной догме молекулярной биологии — трансляции генетической информации в направлении ДНК (ген) – мРНК – белковый продукт. В процессе функционирования разнообразных клеток с целью обеспечения сложных и разнообразных механизмов жизнедеятельности организма постоянно осуществляется регуляция генной активности (стимуляция, угнетение, выключение), что реализуется на уровне транскрипции, скорости синтеза молекул мРНК, постранскрипционных процессах (разрушение посредством микроРНК) и трансляции информации в белковый продукт [14].

Несмотря на гетерогенность популяции ДК в процессе получения культур клеток (воздействие цитокинов и антигенов бактерий, вирусов, опухолевых клеток), используемых для иммунотерапии пациентов с хроническими инфекциями, онкологическими или аутоиммунными заболеваниями незрелые и зрелые ДК, вероятно, имеют одинаковый профиль генов, но, вероятно, различаются некоторыми более или менее выраженными количественными и качественными характеристиками. В связи с этим выполненное сравнительное исследование экспрессии 652 генов иммунной системы одной и той же культуры ДК в процессе праймирования и созревания представляет большой интерес. На рисунке 1 в виде гистограмм представлены результаты распределения частоты интенсивности иммунофлуоресценции ДНК-спотов исследованных генов разработанного нами иммуночипа.

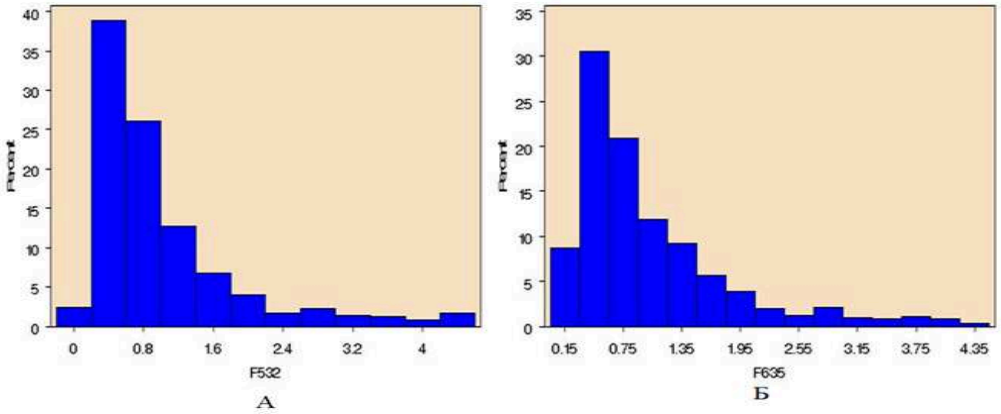



Рисунок 1 — Гистограмма распределения частоты интенсивности флуоресценции ДНК-спотов незрелых ДК(F532) — А и зрелых ДК (F635) — Б

Как видно из представленных на графиках данных можно отметить определенные различия в частотном распределении интенсивности иммунофлуоресценции спотов генов иммунной системы, особенно в области низкой, средней и высокой интенсивности, хотя общая вид обоих графиков схож. В связи с этим нами рассчитаны средние значения общей интенсивности иммунофлуоресценции по всем 652 спотам и кратность изменения экспрессии (рисунок 2). Как видно из рисунка 4 средние значения интенсивности флуоресценции опытной и контрольной проб статистически не различались ($P < 0,05$), но разброс данных интенсивности флуоресценции в опытной пробе гораздо ниже, чем контрольной (незрелые ДК), а среднее значение несколько увеличилось, что подтверждается кратностью изменений.

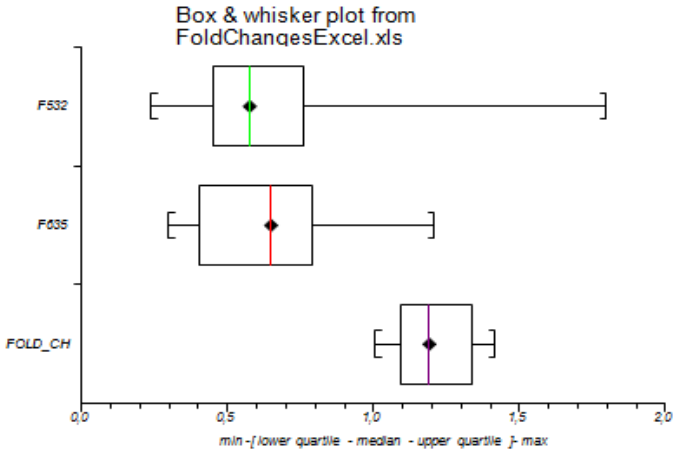



Рисунок 2 — Средние значения интенсивности флуоресценции спотов 652 генов иммуночипа культуры дендритных клеток

С целью более полного анализа полученных данных и выявления закономерностей изменений в экспрессии генов ДК в процессе созревания на основе значений интенсивности флуоресценции спотов исследуемых генов построен график разброса данных (скаттер-плот) (рисунок 3), отражающий взаимосвязи в изменении экспрессии генов.

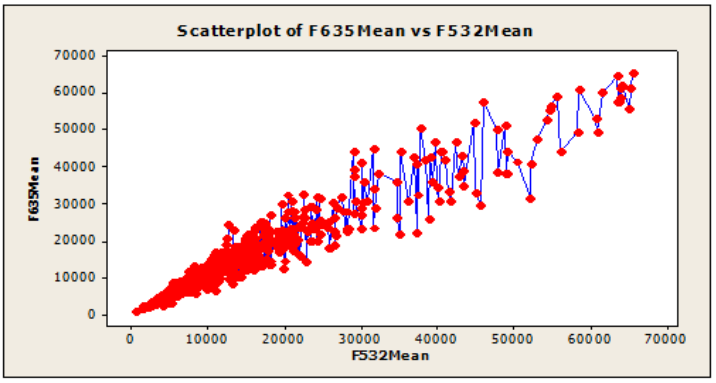



Рисунок 3 — Характеристика разброса данных интенсивности флуоресценции спотов ДНК-матрицы проб незрелых (F532) и зрелых (F635) ДК

Представленная на рисунке 3 информация свидетельствует об отсутствии значимых изменений в интенсивности иммунофлуоресценции в зоне с низкой экспрессией одноименных генов (1000–20000 и нарастании различий в экспрессии генов исследованных проб в зоне средней (20000–40000) и высокой интенсивности флуоресценции (> 40 000). Коэффициент корреляции между значениями интенсивности иммунофлуоресценции пар генов составляет 0,968 (P<0,05).

При анализе результатов микроаррэй важным представляется сравнение интенсивности флуоресценции спотов, что соответствует количеству синтезируемой мРНК, т. е. степени экспрессии гена, и их отклонений в сторону повышения и/или снижения значений в процессе реагирования клеток на определенные сигналы (рисунок 4).

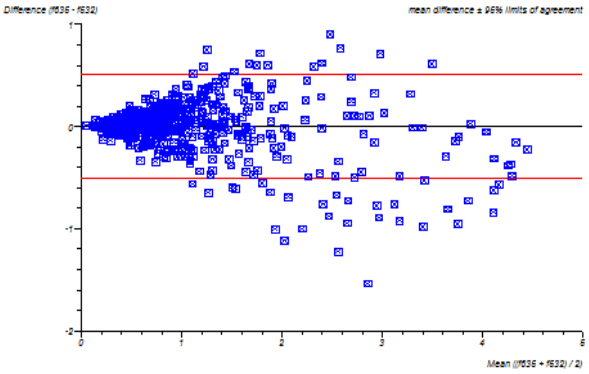



Рисунок 4 — Разброс значений флуоресценции спотов дифференцированно измененных генов культуры дендритных клеток

Рисунок 4 демонстрирует распределение контрольных и экспериментальных данных интенсивности флуоресценции спотов генов с повышенной и сниженной экспрессией. Как видно из рисунка в процессе созревания ДК экспрессия многих генов понижается. Эти данные дополняют представленные на рисунках 1, 2 и 4 результаты и свидетельствуют о модуляции генной активности ДК цитокинами и антигенными компонентами микобактерий в процессе их подготовки к иммунотерапии пациентов.

В таблице представлены гены ДК, идентифицированные как дифференцированно измененные по экспрессии в сторону повышения и снижения. Под влиянием смеси цитокинов и иммуногенного пептида M.tuberculosis различия в экспрессии одноименных генов в процессе праймирования и созревания отмечены по 22, из них 13 — повышение (up regulation) и 9 снижение (down regulation). Гены, позитивно отреагировавшие экспрессией на цитокины созревания и компоненты микобактерий, представляют, вероятно, наибольший интерес и имеют большее биологическое значение. Так, увеличение экспрессии гена рецептора ламинина наблюдается при созревании ДК и означает повышение их возможностей взаимодействия (адгезии) к белкам внеклеточного матрикса. Усиление экспрессии гена виментина обеспечивает формирование выростов цитоплазмы ДК (дендритов) и

также повышает их адгезию и миграционную активность. Повышение экспрессии хемокиновый рецептора CXCR3 улучшает кооперацию ДК с CD4+ Th1 типа, усиливает их активационный потенциал и миграцию. Продукты генов трансформирующего фактора роста, протеинкиназы 12 и ИЛ-1 обеспечивают инициацию и проведение внутриклеточных активационных сигналов. Циклинзависимая киназа 4 участвует в процессах активации клеток в ассоциации с транскрипционным фактором E2. Усиление экспрессии гена хемокинового лиганда CCL3L повышает возможности ДК стимулировать CD4+ Th1 типа, что имеет важное значение для восстановления иммунологической отвечаемости при туберкулезе. Хемокиновый рецептор CCR2.1 при Важно отметить усиление экспрессии генов ответственных за антигенпрезентацию — HLA-DRB1,1 (молекула II класса) и Sonic hedgehog (drosophila) homolog (распознавание компонентов микобактерий).

Таблица — Список генов культур дендритных клеток с измененной экспрессией («+» — повышение экспрессии; «–» — снижение экспрессии)

| Наименования генов | Интенсивность флуоресценции (зрелые ДК — F635) | Интенсивность флуоресценции (незрелые ДК—— F532) | Кратность изменениячения/ флуоресценции |
|---|---|---|---|
| 1. Laminin receptor (adhision) | 24586,7 | 12573,0 | **+1,76** |
| 2. Sytu | 22812,6 | 13279,2 | **+1,72** |
| 3. CXCR3 (ligand of pDC) | 20778,6 | 12273,0 | **+1,69** |
| 4. Vimentin (filaments protein, dendrits) | 13293,4 | 8132,9 | **+1,63** |
| 5. Transforming growth factor, alpha | 11781,3 | 7272,0 | **+1,62** |
| 6. Mitogen-activ. protein kinase 12 | 8750,2 | 5465,2 | **+1,60** |
| 7. Sonic hedgehog (Drosophila) homolog | 32357,2 | 20390,6 | **+1,59** |
| 8. Interleukin 1, alpha, DNA synthesis st. | 17011,7 | 10824,3 | **+1,57** |
| 9. HLA-DRB1,1. Class II molecules | 12131,3 | 7757,7 | **+1,56** |
| 10. CCL3L1,Th1 stimulation, HIV supres | 18923,1 | 12118,4 | **+1,56** |
| 11. CCR2,1. recept. for mon.chemot. prot | 25726,8 | 38867,1 | **+0,66** |
| 12. Cyclin-dependent kinase 4 | 8604,1 | 13152,3 | **+0,65** |
| 13. Matrix metalloproteinase 14 | 29411,6 | 45607,4 | **-0,64** |
| 14. CD1A (lipid uptake, gene trancr. act. | 3296,5 | 5114,1 | **-0,64** |
| 15. BAP29 (BCR associated protein) | 12479,6 | 19938,2 | **- 0,63** |
| 16. Proteoglycan 1, secretory granule | 14212,0 | 22774,2 | **-0,62** |
| 17. V-akt murine thymoma viral oncogene 18. Homolog 1 (SH2-like kinases) | 21545,8 | 34999,3 | **- 0,62** |
| 19. Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta) | 31528,4 | 52092,1 | **- 0,61** |
| 20. Interleukin 8 | 22185,5 | 37202,0 | **- 0,60** |
| 21. C1RL | 6360,1 | 10823,2 | **- 0,59** |
| 22. Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 | 2355,6 | 4066,3 | **- 0,58** |

Из списка генов, экспрессия которых снижалась, следует отметить ген матриксной металлопротеазы 14, CD1A (захват липидов), ген белка, ассоциированного с рецептором В-клеток (BAP29), ген кодирующий протеогликаны (выявляется у незрелых ДК), ген сериновой протеазы (онкоген вирусной тимомы), ген кальмодулина протеазы 1, ген рецептора С1 компонента (C1RL-пептидаза), ген рецептора нейротропной тирозиновой киназы. Изменение экспрессии этих генов выражено менее в сравнении с первой группой генов, а снижение их физиологической роли может иметь значение для созревания и гомогенности популяции зрелых ДК. Естественно, что полученная на небольшом экспериментальном материале предварительная информация в последующем будет валидирована как большим числом исследованных культур, так и подтверждением результатами ПЦР в реальном времени или секвенированием.

Представляет интерес попарное сравнение степени и направленности изменения экспрессии некоторых генов из числа приведенных в таблице (рисунок 5). Из представленного графика четко видны различия в экспрессии генов понижающих в процессе культивирования скорость синтеза мРНК и генов, транскрипция которых усиливается.

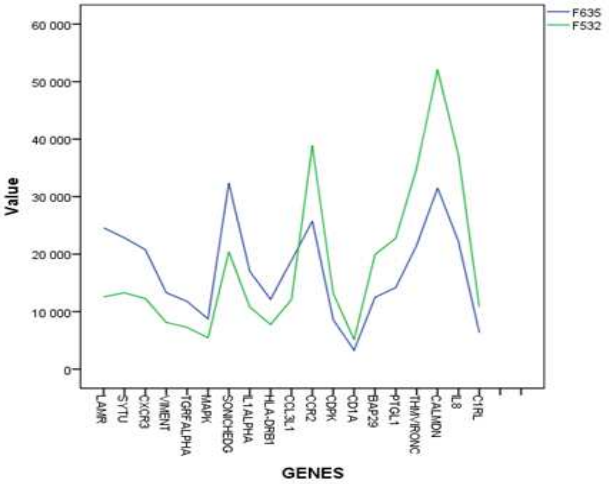



Рисунок 5 — Интенсивность флуоресценции пар генов с дифференцированной экспрессией при праймировании и созревании ДК

Данные таблицы и графика 5 наглядно демонстрируют дифференцированное изменение экспрессии генов, подчеркивая более высокую интенсивность экспрессии ряда генов, которые могут быть новыми маркерами зрелых дендритных клеток и которые ранее не были описаны в литературе.

С целью выяснения взаимосвязей в активационных и регуляторных путях ДК образуемых при праймировании и созревании исследованы сетевые взаимодействия генов в основе данных лежат взаимодействия хемокиновых лигандов и рецептора CXCR3, повышение экспрессии которого наиболее выражено (рисунок 6).

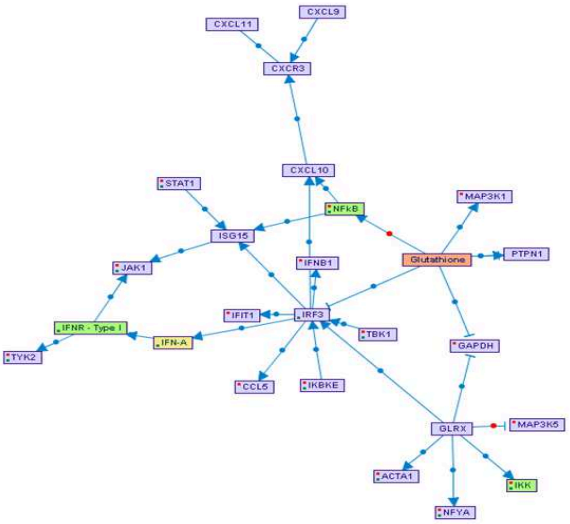



Рисунок 6 — Сетевые взаимодействия генов рецепторов хемокинов и цитокинов, протеиновых киназ и транскрипционных факторов при созревании ДК

Как видно из рисунка 6, взаимодействия хемокиновых лиганд (CXCL11, и CXCL9 ) с соответствующим рецептором (CXR3), участвующих в процессах созревания ДК и повышающих эффективность их взаимодействия с системой Т-лимфоцитов и NK- клеток, серийных взаимодействием с системой интерферонов, протеинкиназ и ядерных факторов транскрипции.

Таким образом, процессы праймирования и созревания культуры ДК при их подготовке к иммунотерапии пациентов с множественнорезистентным туберкулезом сопровождаются дифференцированным изменением экспрессии значительной части генов из 652 исследованных. В сравнении с популяцией незрелых ДК при созревании экспрессия многих генов снижается, в то время как других повышается. Идентифицирована группа генов, экспрессия которых повышается — Laminin receptor,

CXCR3, Vimentin, TGF-a, MAPK12, HLA-DRB1.1, IL-1-a,CCL3L1, CCR2.1, CDK4. Данные гены и количественное определение их экспрессии можно рассматривать в качестве новых маркеров созревания ДК и рекомендовать для включения в стандартизованные протоколы подготовки культур ДК в целях иммунотерапии. Многоступеньчатый и углубленный анализ полученных данных показал, что метод ДНК-микрочипов является высокочувствительным и хорошо стандартизуемым, позволяет анализировать большую совокупность генов, выявлять как отдельные значимые гены, так и кластеры функционально взаимосвязанных генов, достаточно полно характеризующих биологические процессы, протекающие на уровне клеточных популяций в результате эпигеномной регуляции.

Для дендритных клеток характерно несколько периодов и уровней созревания на протяжении жизненного цикла, что обеспечивает их функциональный переход от типа клеток определяющих естественный иммунитет к типу клеток — центральных регуляторов специфического адаптивного специфического противоинфекционного и противоопухолевого иммунитета, формирование толерантности к тканям организма, ограничение аутоиммунных и аллергических реакций.

Созревание является конечной стадией процессов их дифференциации, сопровождается изменениями спектра экспрессируемых поверхностных маркеров, что протекает при участии регуляторных геномических механизмов, на уровне как отдельных генов, так и их кластеров [15, 16]. Незрелые ДК, например, как клетки Лангерганса кожи, характеризуются высокой степенью экспрессии рецепторов обеспечивающих распознавание, захват и процессирование антигенных субстанций. В противоположность этому зрелые ДК во вторичных лимфоидных органах (лимфатических узлах и селезенке) проявляют низкую способностью к захвату антигенов и их процессированию, но высокую активность к презентации процессированных (иммуногенных) пептидов клонам наивных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов и их стимуляции. В процессе созревания ДК усиливается экспрессия поверхностных HLA молекул II класса, а также молекул ко-стимуляции, таких как CD80 и CD86, которые посредством взаимодействия с комплементарными молекулами CD28+Т-лимфоцитов стимулируют их к пролиферации и развитию иммунного ответа. В свою очередь, активированные Т-лимфоциты по типу обратной связи стимулируют дендритные клетки посредством CD40-CD40L взаимодействия, поддерживая их созревание, продукцию ИЛ-12 и выживание. При многих инфекционных заболеваниях (туберкулез, гепатиты В и С, ВИЧ-инфекция, герпес и др.), а также раке процессы, лежащие в основе созревания ДК, нарушаются или блокируются микробными и иными факторами резко снижая антигенпрезентацию и контроль Т-системой иммунитета репродукцию инфекционных агентов, злокачественных клеток и их миграцию (метастазирование)[1, 17].

Транскриптом — совокупность транскриптов (полных или специфических), синтезируемых одной клеткой или группой (популяцией, субпопуляцией) клеток, включая мРНК и не кодирующие РНК. В отличие от генома, который одинаков для всех клеток определенной линии, транскриптом существенно зависит от условий микроокружения клетки, что в конечном итоге и определяет рамки и профиль экспрессируемых клетками генов (эпигеномная регуляция) в определенный период [18]. Таким образом, транскриптом реально является первым уровнем фенотипа, т. е. первым уровнем развертывания генетической информации, заключенной в геноме. Он характеризуется пространственной и временной дифференцированностью в распределении разных генов и изоформ транскриптов отдельного гена. Исследование транскриптома иммунокомпетентных клеток — одно из актуальных направлений функциональной геномики. Важнейшим элементом функциональной геномики является количественный анализ экспрессии генов, под которым понимают анализ транскриптома путем количественной оценки транскрипционной активности генов по количеству синтезируемых основных продуктов — матричной (информационной) РНК или определенного белка [18]. Анализ экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов (англ.DNA-microarray) представляется новым и весьма эффективным методом. С помощь кДНК-микрочипов удобно исследовать различия в спектре и уровнях экспрессии сотен и тысяч генов пациентов с инфекционными и иными заболеваниями, изучать транскриптомы нормальных и пораженных тканей, оценивать биологический эффект лекарственных средств химической и биологической природы. Для стандартизации и валидации данных созданы специальные математические алгоритмы (программы), а также базы данных транскриптомов и результатов микроаррэй [19, 20].

Анализ дифференцированной экспрессии генов — ключевой элемент характеристики и понимания молекулярных основ вариации фенотипа в медицине, эпигеномной модуляции функци-

онирования генома, выявления генов прямо или косвенно связанных с определенной патологией, предрасположенностью к заболеваниям, неэффективным или протективным иммунитетом, влиянии иммуномодуляторов [21–23]. С этой целью рекомендуется несколько методических подходов: а) определение изменений экспрессии определенного значимого гена; б) анализ кластеров функционально связанных генов; в) создание и анализ сетевых взаимосвязей (взаимодействий генов и их продуктов) — мРНК, белков, кластеризация генов «изменившихся» позитивно и негативно.

**Литература**


1. Титов, Л.П. Иммунология: терминологический словарь / Л.П.Титов. — М., 2008. — 521 с.
2. Steinman, R.M. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 1. Morphology, quantification, tissue distribution / R.M. Steinman, Z.A. Cohn // J. Exp. Med. — 1973. — Vol. 137, № 5. — P. 1142–1162.
3. Langerhans, P. Uber die Nerven der menschlichen Haut. Virchows Arch. / P. Langerhans // Anat.Pathol. — 1868. — Vol. 44. — P. 325–327.
4. Nomenclature of monocytes and dendtitic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock [et al.] // Blood. — 2010. — Vol. 116. — e74–e80.
4. Титовт Л.П. Микро-РНК: новый класс регуляторных молекул иммунного ответа и инфекционного процесса / Л.П.Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск, 2012. — Вып. 5. — С. 256–261.
5. Expression of Th2 –skewed pathology mediators in monocyte-derived type 2 of dendritic cells (DC2) / M. Hata [et al.] // Immunol. Letters. — 2009. — Vol. 126. — P. 29–36.
6. DC-atlas: a system biology resource to dissect receptor specific signal transduction in dendritic cells / D.Cavalien [et al.] // Immun. Res. — 2010. — Vol. 6, № 1. — P. 10–20.
7. Dendritic cell-based immunotherapy / T. Osada [et al.] // Int. Rev. Immunol. — 2006. — Vol. 25. —P. 377–413.
8. Fadilah, S. Dendritic cell immunobiology and potential roles in immunotherapy / S. Fadilah, S.K. Cheong // Malasian J. Pathol. — 2007. — Vol. 29, № 1. — P. 1–18.
9. Иммунофизиологическая и клиническая эффективность иммунотерапии пациентов с мультирезистентным туберкулезом легких инновационной нановакциной на основе аутологичных дендритных клеток / Л.П. Титов [и др.] // Здравоохранение. — 2012. — № 1. — С. 53–60.
10. An Optimized method for manufacturing a clinical scale dendritic cell-based vaccine for the treatment of gliablastoma / S. Nava [et al.] // PlosOne. — 2012. — Vol.7, № 12. — e52301.
11. Belz, G.T. Transcriptional programming of the dendritic cell network / G.T. Belz, S.L. Nutt // Nat. Rev. Immunol. — 2012. — Vol. 12. — P. 101–113.
12. Identification of transcriptional regulation in the mouse immune system / V. Jojic [et al.] // Nat. Immunol. — 2013. — Vol. 14, № 6. — P. 633–643.
13. Титов, Л.П. Геномико-протеомические основы эволюции и молекулярной эпидемиологии вирусов / Л.П. Титов, В.И. Вотяков // Весці НАНБ. Мед. серия. — 2011. — № 1. — С. 109–117.
14. Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models — unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability / K. Lundberg [et al.] // PlosOne. — 2013. — Vol. 8, № 1. — e52875.
15. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon Paracoccidoides brasiliensis infection / A.H.Tavares [et al.] // Plosneglecto tropical diseases. — 2012. — Vol. 6, № 1. — e1459.
16. Gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells in response to HIV-LPSs stimulation / L. Buonaguro [et al.] // BMC Bioinformatics. — 2008. — Vol. 9, Suppl. 2. — P. 5.
17. Frith, M.C. Genomics: the amaizing complicity of the human transcriptome / M.C. Frith // Eur. J. Human Genetics. — 2005. — Vol. 13. — P. 894–897.
18. Naidu, C.K. Current Knowledge on microarray technology — an overview / C.K. Naidu, Y. Suneetha // Tropical J. Pharmaceut. Res. — 2012. — Vol.11, № 1. — P. 153–164.
19. Selvaraj, S. Microarray data analysis and mining tools / S. Selvaraj, J. Natarajan // Bioinformation. — 2011. — Vol. 6, № 3. — P. 95–99.
20. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic Lactobacillus thamnosus Lcr35 / B. Evrard [et al.] // PlosOne. — 2011. — Vol. 6, № 4. — e18735.
21. Stimulatory effect of Echinacea purpurea extract on the trafficking activity of mouse dendritic cells: relevant by genomic and proteomic analyses / S-Yi Yin [et al.] // BMC Genomics. — 2010. — Vol. 11. — P. 612–630.
22. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view / L. Castillo [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. — 2011. — Vol. 60. — P. 457–466.


## ANALYSIS OF GENE EXPRESSION OF CULTURE DENDRITIC CELLS PRIMING AND MATURATION OF BY DNA-MATRIX


**Titov L.P., Goncharov A.E., Liauchenia M.V., Sprindzhuk M.V.**

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



Dendritic cells due to its multi-functionality are involved in many immunological processes that provide mechanisms for both natural and adaptive immunity. Participation in the initiation and regulation of

the adaptive immune response of dendritic cells evolutionarily more recent acquisition, damage biological factors (viruses, bacteria, protozoa) and of a different nature. Scientists of different professions display a wide interest in dendritic cells because of their possible applications cultures obtained ex vivo, in clinical practice. However, the clinical success of the use of dendritic cells is limited due to insufficient knowledge of the basic fundamentals of the genome of these cells at different stages of development, maturity and participation in the immunological processes. The study of the transcriptome of the dendritic cells and the development of targeted epigenetic regulation of gene expression is a priority research areas. We used the classical approach of isolation and cultivation of bone marrow mielodnyh dendritic cells (CD34+) for immunotherapy of patients with multidrug-resistant tuberculosis. The study of the expression of immune system genes carried by the developed DNA microarray. The data are analyzed by modern methods of bioinformatics. Identified a group of genes differentially changed DC gene expression during priming and maturation, as defined may be used as markers for mature cell cultures, as well as scientific purposes.

**Keywords:** dendritic cell maturation, DNA microarray, transcriptome DC, epigenetic regulation.

Поступила 02.09.2013

## ТРИПСИНОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

**Юпатов Г.И., Прищепенко В.А., Прищепенко О.А.**

*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**Резюме.** Одним из возможных исходов вирусных гепатитов B, C и D является цирроз печени. Этот процесс сопровождается некрозом печеночных клеток, что проявляется развитием печеночно-клеточной недостаточности. Одним из проявлением нарушения синтетической функции печени является снижение выработки различных белковых соединений, некоторые из которых обладают трипсиноподобной активностью. Для оценки трипсиноподобной активности в настоящее время широко используют определение БАПНА-амидазной активности. При изучении данной активности нами установлено, что ее уровень у пациентов с циррозом печени ниже, чем у здоровых доноров. Также установлены взаимосвязи между уровнем БАПНА-амидазной активности и клинико-лабораторными данными пациентов.

**Ключевые слова:** БАПНА-амидазная активность, цирроз печени.

**Введение.** Цирроз печени — это диффузный процесс, характеризующийся фиброзом и трансформацией нормальной структуры печени с образованием узлов. В экономически развитых странах цирроз входит в число шести основных причин смерти пациентов от 35 до 60 лет, составляя 14–30 случаев на 100 тыс. населения. Цирроз печени находится на первом месте среди причин смертности от заболеваний органов пищеварения. Ежегодно в мире умирают 40 млн человек от вирусного цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, развивающейся на фоне носительства вируса гепатита B.

Уровень заболеваемости болезнями органов пищеварения в РБ за 2008 г. составил 2,8 тыс. случаев на 100 тыс. населения. Ежегодно в Беларуси от болезней органов пищеварения умирает 2,6 тыс. человек в возрасте от 15 до 59 лет. Из них 1,5 тыс. человек умирает от цирроза печени (2008 г.).

Чаще цирроз развивается при длительной интоксикации алкоголем (по разным данным от 40–50 до 70–80%) и на фоне вирусных гепатитов B, C и D (30–40%). Более редкие причины цирроза — болезни желчевыводящих путей (внутри- и внепечёночных), застойная сердечная недостаточность, различные химические и лекарственные интоксикации.

В патогенезе цирроза печени ведущая роль отводится хроническому воспалению, при котором происходит некроз гепатоцитов и одновременно их регенерация. Этот процесс сопровождается делением стромы печени, что приводит к фиброзу и нарушению архитектоники печеночных долек, с формированием ложных долек [1].

Некроз печеночных клеток приводит к печеночно-клеточной недостаточности и прогрессирующему нарушению функций печени: детоксикационной, что приводит к стимуляции микроокружения гепатоцитов, усиливающей хроническое воспаление и фиброз ткани [2], синтетической и др.

Одним из проявлений нарушения синтетической функции печени является снижение выработки белковых соединений, таких как альбумин, фибриноген, протромбин, проконвертин, проакцелерин и других. Некоторые из этих соединений обладают ферментативными свойствами, в частности проявляют трипсиноподобную активность [3]. Изменение уровня трипсиноподобной активности сыворотки крови может явиться показателем степени печеночно-клеточной недостаточности.

Для оценки трипсиноподобной активности в настоящее время в качестве хромогенного субстрата широко используется бензоиларгинин-р-нитроанилид (БАПНА). При расщеплении этого субстрата по амидной связи образуется р-нитроанилин, который изменяет оптическую плотность реакционной смеси.

**Цель:** определить уровень БАПНА-амидазной активности сывороток крови пациентов с циррозом печени в сравнении с сыворотками здоровых доноров и оценить взаимосвязь этого показателя с клинико-лабораторными данными пациентов.

**Материалы и методы.** Нами исследованы сыворотки 20 пациентов с циррозом печени и хроническим гепатитом, в том числе и с установленным вирусным генезом заболевания, находившихся на лечении в отделениях гастроэнтерологии и РАО УЗ «2-я ВОКБ». Контрольную группу составили 32 здоровых донора.

Определение трипсиноподобной активности сывороток проводили с использованием модификации метода Эрлангера [4]. При определении БАПНА-амидазной активности сывороток крови реакционная смесь состояла из 0,2 мл раствора БАПНА и 0,005 мл исследуемой сыворотки. В качестве отрицательного контроля использовали 0,005 мл физиологического раствора и 0,2 мл раствора БАПНА. Для устранения искажения результатов вследствие собственной окраски сыворотки оптическую плотность в лунках определяли как разницу оптической плотности после инкубации и до инкубации.

Для пересчета полученного результата в пикокаталы использовалась формула $Y=0{,}028+11\times Eоп$, где Y — искомый результат, Еоп — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Так же проводился анализ историй болезни данных пациентов с оценкой клинического диагноза, общего и биохимического анализов крови, общего анализа мочи, показателей коагулограммы.

Статистическая обработка данных проводилась в программе STATGRAP.2_1. Для оценки достоверности отличий результатов двух групп использовался критерий Манна-Уитни [5].

**Результаты и их обсуждение.** При оценке результатов определения БАПНА-амидазной активности сыворотки крови пациентов с циррозом печени уровень активности составил: медиана 0,46 Пкат, 25–75 процентили: 0–1,21 Пкат, что с высокой степенью достоверности ниже, чем уровень активности сывороток крови здоровых доноров (2,1 Пкат; 1,74–2,62 Пкат) (таблица 1).

Таблица 1 — БАПНА-амидазная активность сыворотки крови

| Группа | N | Медиана, Пкат | Процентиль 25–75, Пкат | Достоверность отличий |
|---|---|---|---|---|
| Больные циррозом печени | 20 | 0,46 | 0–1,21 | $p< 0{,}0000001$ |
| Здоровые доноры | 31 | 2,1 | 1,74–2,62 | |

При изучении историй болезни данных пациентов и анализе полученных данных нами были выявлены определенные корреляции. При анализе диагнозов пациентов было установлено, что уровень трипсиноподобной активности выше у пациентов с хроническим гепатитом, у больных циррозом печени уровень данной активности оказался тем меньше, чем выше класс тяжесть по Чайлд–Пью выставленный клинически (коэффициент корреляции (R) =-0,63; сила корреляции (R2) =39,44; p=0,0053).

При изучении общего анализа крови пациентов оказалось, что уровень БАПНА-амидазной активности находиться в обратной зависимости от уровня СОЭ (R=0,668; R2 =44,63; p=0,0018). Данная зависимость отражена на следующем графике (рисунок 1).

При оценке показателей биохимического анализа крови было выявлено, что уровень трипсиноподобной активности сыворотки крови пациентов с циррозом печени и хроническим гепатитом находится в тесной зависимости с такими показателями биохимического анализа крови как уровень альбумина в сыворотке крови (R=0,60, R2 =36,67; Ст. о.=0,74; p=0,0217) (рисунок 2), АЛТ (R=0,79; R2=61,85; p=0,0005) (рисунок 3), ГГТ (R= 0,706; R2=49,9; p=0,0033) (рисунок 4).

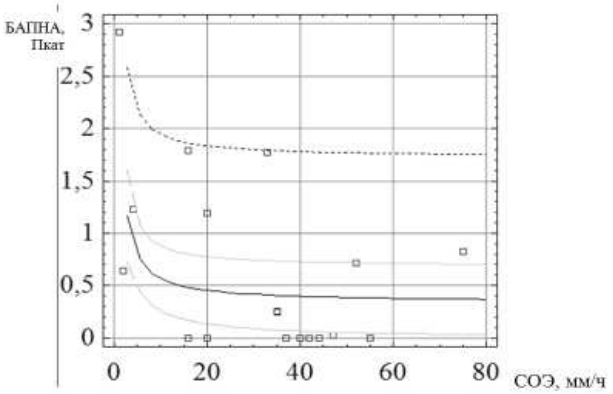



Рисунок 1 — Взаимосвязь между уровнем БАПНА-амидазной активности и СОЭ (БАПНА=0,339574+2,28507/СОЭ)

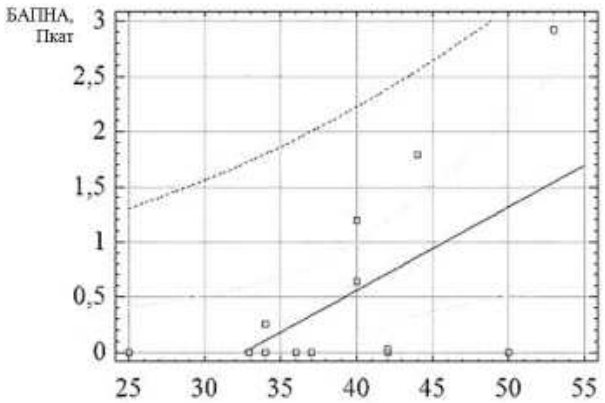



Рисунок 2 — Зависимость БАПНА-амидазной активности от уровня альбумина в сыворотке крови (БАПНА=-2,46441+0,075562*Альбумин)

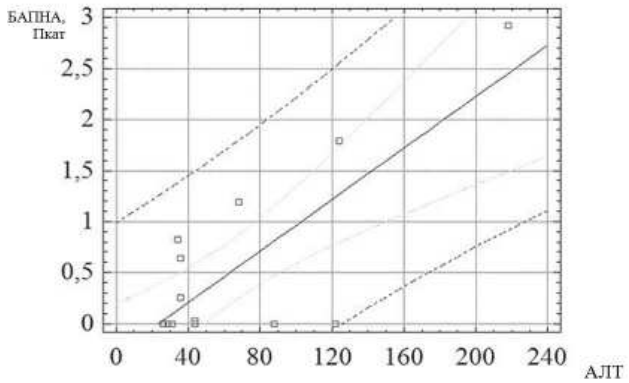



Рисунок 3 — Взаимосвязь между уровнем БАПНА-амидазной активности и уровнем АЛТ (БАПНА=-0,299105+0,0126175*АЛТ)

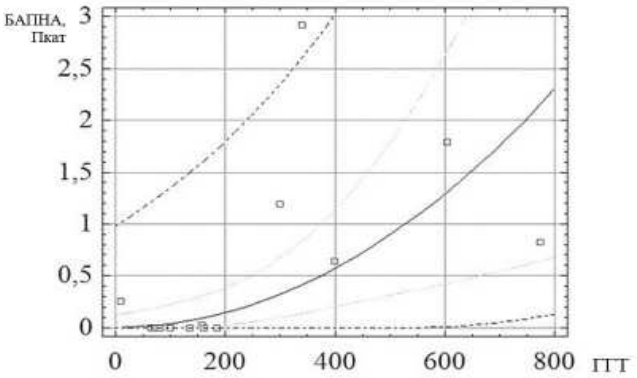



Рисунок 4 — Зависимость уровня БАПНА-амидазной активности от ГГТ (БАПНА=(-0,00586982+0,00190501)*ГГТ$^2$)

**Выводы:**

1. Уровень БАПНА-амидазной активности сыворотки крови у пациентов с циррозом печени и хроническими гепатитами (медиана 0,46 Пкат, 25–75 процентили: 0–1,21 Пкат) с высокой степенью достоверности ниже (P<0,0000001), чем у здоровых доноров (медиана: 2,1 пкат; 25–75 процентили: 1,74–2,62 Пкат).

2. Уровень трипсиноподобной активности выше у пациентов с хроническим гепатитом, у больных циррозом печени уровень данной активности тем меньше, чем выше класс тяжесть по Чайлд–Пью выставленный клинически (коэффициент корреляции (R) =-0,63; сила корреляции (R2) =39,44; p=0,0053).

3. Уровень БАПНА-амидазной крови находится в прямой зависимости от следующих показателей биохимического анализа крови: уровня альбумина (R=0,60; R2 =36,67; p=0,0217), АЛТ (R=0,79; R2 =61,85; p=0,0005), ГГТ (R= 0,706; R2 =49,9; p=0,0033).

4. Корреляций между уровнем БАПНА-амидазной активности и показателями общего анализа мочи и коагулограммы выявлено не было (p>0,05).

**Литература**

1. Основы клинической гепатологии. Заболевания печени и билиарной системы / В.Г. Радченко [и др.]. — СПб.: Диалект, 2005. — 864 с.

2. Liver cirrhosis / M. Pinzania [et al.] // Best Pract.&Res. Clin. Gastroenterol. — 2011. — Vol. 25, Issue 2. — P. 281–290.

3. Внутренние болезни: учеб. в 2-х т. / Под ред. А.И. Мартынова [и др.] // М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — Т. 2. — 648 с.

4. Окулич В.К., Косинец А.Н., Сенькович С.А., Конопелько Е.А. Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов класса G / В.К. Окулич [и др.] // Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний / РНМБ. — Минск, 2002.

5. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Практика, 1999.

## TRYPSIN SIMILAR ACTIVITY OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CIRRHOSIS OF THE LIVER

**Yupatov G.I., Pryschepenko V.A., Pryschepenko O.A.**

*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus*

One of possible outcomes of virus hepatitises B, C and D is the liver cirrhosis. This process is accompanied with necrosis hepatic cells that is shown by development of hepatic-cellular insufficiency. One of display of infringement of synthetic function of a liver is decrease in development of various proteins connections, some of which possess trypsin similar activity. For an estimation trypsin similar activity now widely use estimation of BAPNA-amidase activity. At studying of the given activity we was established that its level at patients with a liver cirrhosis more low, than at healthy donors. As we was found a connection between level of BAPNA-amidase activity and the clinic dates of patients are established.

**Keywords:** BAPNA, activity, liver cirrhosis.

Поступила 06.09.2013

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ИЛ-1 У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПЛЕВРИТОМ И ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

**Янович О.О.[1], Титов Л.П.[1], Дюсьмикеева М.И.[2], Шпаковская Н.С.[2], Паплевка Т.В.[2]**

*[1]РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*[2]РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь*

**Резюме.** Выполнено исследование частоты генетических форм антагониста рецептора ИЛ-1 у 17 пациентов с плевритом туберкулезной этиологии, 14 пациентов с плевритом нетуберкулезной этиологии, 35 пациентов с туберкулезом легких. Генотипическим анализом установлено увеличение частоты генотипа 2/L у пациентов с туберкулезным плевритом по сравнению с плевритом нетуберкулезной этиологии (47,1% против 14,3%, $p<0,05$). У пациентов с туберкулезом легких частота данного генетического варианта гена также была достоверно выше по сравнению с группой пациентов с плевритом нетуберкулезной этиологии (37,2%). Носительство генотипа 2/L антагониста рецептора ИЛ-1 ус пациентов туберкулезом легких может рассматриваться как дополнительный фактор риска развития тяжелого течения туберкулеза.

**Введение.** Туберкулез легких — глобальная проблема современного мира, представляющая особую актуальность для стран со средним и низким уровнем жизни. Исследованиями установлено, что в возникновении и характере течения туберкулеза большое значение имеют средовые и генетические факторы, как возбудителя инфекции, так и хозяина [1].

Инфицирование микобактерией туберкулеза завершается установлением латентной формы туберкулеза (или латентной формы туберкулезной инфекции) — состоянием, при котором микроорганизм локализуется путем образования гранулем, а у пациента отсутствуют клинические, бактериологические и рентгенологические проявления заболевания. У лиц с высокой эффективностью механизмов Т-клеточного иммунного ответа данная форма процесса может сохраняться на протяжении всей жизни. У определенной части инфицированных лиц процесс может активизироваться, трансформируясь в клинически значимые формы — инфильтративную, очаговую или фиброзно-кавернозную. Как известно, туберкулез протекает с выраженными реакциями гиперчувствительности замедленного типа, реализуемыми субпопуляцией CD4_ T-h1 типа, продуцирующими провоспалительные цитокины, которые принимают активное участие в генерации антимикробной активности макрофагов [2]. Активированные макрофаги, поглотившие микобактерии, экспрессируют на поверхности иммуногенный комплекс (пептиды белков микобактерий + молекулы II- класса), кооперируются с субпопуляциями Т-клеток и продуцируют в межклеточное пространство интерлейкин-1 (ИЛ-1), который активирует субпопуляции Т-лимфоцитов (CD4+; CD8+).

В патогенезе туберкулеза легких одним из главных регуляторов воспаления и естественным конкурентным ингибитором ИЛ-1 является антагонист рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1РА) блокирующий связывание ИЛ-1 с клеточными рецепторами и инициацию активационных сигналов [2].

У больных легочным туберкулезом отмечается высокая концентрация ИЛ-1, что указывает на участие этого цитокина в иммунитете и системном воспалении при туберкулезе легких [3]. Показано также, что при туберкулезном плеврите плевральные макрофаги продуцируют ИЛ-1 и антагонист рецептора ИЛ-1 [4], которые участвуют в регуляции местного клеточного иммунитета.

В гене ИЛ-1РА известен полиморфизм — вариабельность по числу 86-членных тандемных повторов во 2-м интроне [5]. Он влияет на секрецию белка ИЛ-1РА, так как гомо- и гетерозиготы по аллелю 2* продуцируют значительно больше белка в ответ на стимуляцию гранулоцит-макрофагальным колониестимулирующим фактором [6], регулирующих местный клеточный ответ.

**Цель** работы: исследовать распределение частот генотипов гена антагониста рецептора ИЛ-1РА у пациентов с туберкулезным плевритом и туберкулезом легких.

**Материалы и методы.** Было обследовано 17 больных с туберкулезным плевритом (группа 1), 35 пациентов с туберкулезом легких (группа 2) и 14 человек с плевритом нетуберкулезной этиологии (группа 3). Во всех группах проведено определение полиморфизма гена ИЛ-1РА. Полиморфизм гена ИЛ-1РА представляет собой наличие в гене тандемных повторов размером 86 п.о. классифицированных согласно El-Omar E.M. с сотр. [5] следующим образом: аллель A — 4 повтора (410 п.о.), аллель B — два повтора (240 п.о.), аллель D — пять повторов (500 п.о.), аллель E — три повтора (325 п.о.) и аллель C — шесть повторов (595 п.о.). Для проведения статистической оценки полученных данных проводят объединение аллелей с более чем двумя повторами в группы: L — длинный генотип, 2* — короткий генотип (аллель 2* выделяют в отдельную группу).

Для определения числа повторов в гене ИЛ-1РА использованные в работе следующие праймеры:

F - 5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3'

R - 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'.

***Режимы ПЦР.*** Условия ПЦР реакции следующие: 94°C — 5 мин, 28 циклов 94°C — 30 с, 57°C — 30 с и 72°C — 30 с, элонгация 72°C — 5 мин.

***Реакционная смесь.*** Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. В нее входили 1 мкл 10 пмоль раствора праймеров F и R, 2 мкл 10 х ПЦР-буфера, 2 мкл 25ммоль раствора $MgCl_2$, 2 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед/мкл Taq-полимеразы, вода до объема 25 мкл.

***Амплификация.*** Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм).

***Статистика.*** Использовали методы вариационной биологической статистики с определением достоверности различий ($p<0,05$).

**Результаты и их обсуждение.** В таблице представлены результаты частоты встречаемости генотипов ИЛ-1РА среди обследованных пациентов.

В ходе исследования выявлено, что во всех исследованных группах наиболее часто встречается генотип L/L. Частота гомозигот по генотипу L/L составила среди больных ТЛ 60%, больных ТП — 41,2% и наибольшей была у пациентов с нетуберкулезным плевритом — 78,6%.

Среди пациентов туберкулезом легких частота встречаемости генотипов 2/L и 2/2 составила 37,2 и 2,8% соответственно.

Таблица — Частота встречаемости генотипов (по числу тандемных повторов) гена ИЛ-1РА

| Пациенты | L/L | 2/L | 2/2 |
|---|---|---|---|
| Нетубер.плеврит (n=14) | 78,6 | 14,3 | 7,1 |
| Туберкулезный плеврит (n=15) | 41,2 | 47,1* | 11,7 |
| Туберкулез (n=35) | 60 | 37,2 | 2,8 |

Примечание. * — достоверно при сравнении с группой пациентов с нетуберкулезным плевритом, $p<0,05$.

Генотипический анализ выявил увеличение частоты генотипа 2/L у пациентов с туберкулезным плевритом по сравнению с плевритом нетуберкулезной этиологии (47,1 против 14,3%, $p<0,05$).

Тяжесть воспалительного процесса при туберкулезе, наряду с вирулентностью *M. tuberculosis*, определяется балансов провоспалительных цитокинов, продуцируемых клетками иммунной систе-

мы. ИЛ-1 один из главных медиаторов воспаления, провоспалительные свойства которого подавляются его ингибитором ИЛ-1РА.

Гены семейства ИЛ-1 кодируют три сложных белка: ИЛ-1а, ИЛ-1б, ИЛ-1РА. Каждый из этих генов является полиморфным и существует множество доказательств, что некоторые аллели и гаплотипы связаны с повышенной восприимчивости к заболеваниям воспалительного характера [7, 8].

Так как ИЛ-1РА и ИЛ-1б конкурируют друг с другом за связывание с одними и теми же клеточными рецепторами, то важное влияние на воспалительный процесс оказывает соотношение ИЛ-1РА/ИЛ-1б. В работе Santtila S. с соавт. установлено [8], что наличие аллели 2* в гене ИЛ-1РА увеличивает продукцию ИЛ-1б (*in vitro*), не зависимо от наличия полиморфных аллелей в гене ИЛ-1б. Это указывает, что известные замены в гене ИЛ-1б не являются главными регуляторами продукции белка, а решающую роль играют аллели в гене ИЛ-1РА.

Wilkinson R.J. с сотр. установили, что аллель 2* в гене ИЛ-1РА связана с увеличением экспрессии гена и как следствие повышением секреции белка при действии туберкулина. Показано, что для эффективного действия уровень ИЛ-1РА должен быть выше уровня ИЛ-1, что в полной мере проявляется у пациентов с наличием аллели 2* в гене ИЛ-1РА. При этом выявлена четкая связь между аллелью 2* и снижением гиперчувствительности замедленного типа [9].

Сниженный ответ на туберкулин у больных туберкулезной инфекцией может указывать, что адаптивная иммунная система, в ряде случаев, не вовлечена в иммунный ответ. Отсутствие адаптивного ответа может значительно утяжелять процесс, как это наблюдают у больных хроническим деструктивным туберкулезом [11].

В работе Yanagawa H. с сотр. показана регулирующая роль ИЛ-1РА в отношении ИЛ-1 у больных туберкулезным плевритом [11]. Полученные нами данные указывают на возможное влияние генотипа 2/L гена ИЛ-1РА на предрасположенность организма к развитию туберкулезного плеврита. Изменение соотношения продукции ИЛ-1б и ИЛ-1РА в сторону увеличения доли ИЛ-1РА на системном уровне и в очаге воспаления способствует торможению эффектов ИЛ-1б и может служить признаком хронизации воспалительного процесса.

**Литература**

1. Титов, Л.П. Иммунология: терминологический словарь / Л.П. Титов. — М.: МИА, 2008. — 521 с.

2. Иммуногенетический профиль больных туберкулезом легких и возможности совершенствования терапии / Л.И. Арчакова [и др.] // Вестн. С.-Петербург. ун-та. — 2009. — Сер. 11, Вып. 2. — С. 61–66.

3. Leeб J.H. Changes of plasma interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-8 and other serologic markers during chemotherapy in patients with active pulmonary tuberculosis / J.H. Lee, J.H. Chang // Korean J. Intern. Med. — 2003. — Vol. 18, № 3. — P. 138–145.

4. Interleukin-1 receptor antagonist in pleural effusion due to inflammatory and malignant lung disease / H. Yanagawa [et al.] // Eur. Respir J. — 1996. — Vol. 9, № 6. — P. 1211–1216.

5. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer / E.M. El-Omar [et al.] // Nature. — 2000. — Vol. 404. — P. 398–402.

6. Polymorphisms of interleukin-1R receptor antagonist genes in patients with chronic hepatitis B in Iran / M. Ranjbar [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2006. — Vol.12, № 31. — P. 5044–5047.

7. Allelic polymorphism in IL-1band IL-1 receptor antagonist genes in inflammatory bowel disease / G. Bioque [et al.] // Clin. Exp. Immunol. — 1995. — Vol. 102. — P. 379–383.

8. Santtila, S. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 production *in vitro* / S. Santtila, K. Savinainen, M. Hurme // Scand. J. Immunol. — 1998. — Vol. 47, № 3. — P. 195–198.

9. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin-1 receptor antagonist and IL-1bon tuberculosis / R.H. Wilkinson [et al.] // J. Exp. Med. — 1999. — Vol. 189. — P. 1863–1873.

10. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе / Е.В. Свирщевская [и др.] // Пробл. мед. микологии. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 3–13.

11. Interleukin-1 receptor antagonist in pleural effusion due to inflammatory and malignant lung disease / H. Yanagawa [et al.] // Eur. Respir. J. — 1996. — Vol. 9, № 6. — P. 1211–1216.

## POLYMORPHISM OF THE GENE OF THE ANTAGONIST OF THE RECEPTOR OF SILT-1 AT PATIENTS WITH TUBERCULAR PLEURISY AND TUBERCULOSIS OF LUNGS

**Yanovich O.O.[1], Titov L.P.[1], Dusmikeeva M.I.[2], Shpakovskaya N.S.[2], Paplevka T.V.[2]**

*[1]Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology;*

*[2]Republican Research & Practical Center for Pulmonology & Phthisiology, Minsk, Belarus*

IL-1 and IL-1 antagonism may play important roles in the inflammatory process in the pleural cavity. The aim of this study is to evaluate interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphisms frequency in patients with tuberculous pleurisy and pulmonary tuberculosis. Analysis of IL-1-RA variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphisms was performed by PCR. The frequency of IL-1RA 2/L (47.1%) genotype was significantly higher (p=0.05) in patient with tuberculous pleurisy than that is found in non-tuberculosis pleurisy group (14.3%). Our findings indicate that genotype 2/L gene IL-1RA gene may play role in susceptibility to tuberculous pleurisy.

Поступила 06.09.2013

# ВИРУЛИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «АНОЛИТ НЕЙТРАЛЬНЫЙ» В ОТНОШЕНИИ РОТАВИРУСОВ

**Виринская А.С., Гудков В.Г., Ляховская Н.В., Дмитраченко Т.И., Семенов В.М., Бурак И.И., Хныков А.М.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии;*

*Витебский Государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

Ротавирусная инфекция (РВИ) представляет одну из серьезных социально-экономических проблем в сфере здравоохранения, занимает ведущее место в структуре острых кишечных инфекций (ОКИ). Высокая устойчивость вируса во внешней среде и к ряду дезинфектантов, используемых в учреждениях здравоохранения (УЗ), большое число вирусоносителей и пациентов с бессимптомными формами заболевания, возможность реализации различных путей и факторов распространения инфекции способствуют распространению вируса в детских коллективах, в том числе в УЗ стационарного и амбулаторного типа.

Немаловажное значение для предупреждения внутрибольничного распространения РВИ имеет эффективность применяемых дезинфицирующих средств. Существенное значение при этом имеет эффективность дезинфекции, направленной на снижение уровня вирусной контаминации поверхностей и воздуха, при этом наиболее действенным способом является аэрозольное распыление дезинфектанта.

Проблемой профилактики внутрибольничного распространения РВИ является также высокая резистентность ротавирусов к дезинфицирующим средствам, что обуславливает предпочтительность использования в стационарах дезинфектантов с установленной эффективностью в отношении именно этого возбудителя. Несмотря на широкий перечень дезинфицирующих средств, оказывающих губительное действие на ротавирус, использование многих из них в учреждениях здравоохранения экологически небезопасно и экономически невыгодно, поэтому внедрение новых, экологически чистых и экономически выгодных дезинфицирующих средств является актуальным.

В последние годы большое внимание придается использованию в УЗ дезинфицирующих средств на основе электрохимически активированных растворов, полученных из слабоминерализованных водных растворов натрия хлорида, к которым относится анолит. В отличие от многих других средств, используемых для дезинфекции, основными действующими компонентами анолита являются образующиеся в ходе биоэлетрохимических реакций метастабильные перекисные соединения, которые обычно синтезируются в организме человека и участвуют в процессах фагоцитоза, что обеспечивает наименьшую токсичность указанного средства. Безвредность анолита позволяет рекомендовать его к использованию в УЗ педиатрического профиля. Его применение не требует удаления остатков дезинфицирующего средства, что создает дополнительные преимущества при проведении дезинфекции. Дезинфицирующий раствор анолита нейтрального получают путем электрохимической активации на электрохимической установке для получения электрохимически активированных растворов из водных растворов хлоридов (NaCl, KCl и др.) в соответствии с «Руководством по эксплуатации».

**Целью** наших исследований являлось изучение вирулицидной активности дезинфицирующих растворов анолита нейтрального в отношении ротавирусов. В исследованиях использовались 2 образца дезинфицирующего раствора анолита нейтрального: образец № 1 с pH 6,87 ед, окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП) +950 мВ, содержанием активного хлора (Сах) 200 мг/дм$^3$; образец № 2 с pH 6,74 ед, (ОВП) +950 мВ, содержанием активного хлора (Сах) 100 мг/дм$^3$.

Определение вирулицидной активности дезинфицирующих растворов анолита нейтрального проводилось суспензионным методом, активность ротавируса до и после экспозиции с испытуемым дезинфицирующим средством оценивалась в реакции нейтрализации вируса в культуре клеток по проявлению цитопатического эффекта вируса, а также с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) по антигенной активности ротавируса.

С этой целью двухдневную культуру клеток МА-104, выращенную на синтетической среде 199 с 10% сыворотки плодов коров, трижды промывали раствором Хенкса. К ротавируссодержащей суспензии добавляли равное количество дезинфицирующих растворов и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Готовили 10-кратные разведения суспензий вирус+дезинфицирующий раствор, вирус+среда 199 от $10^{-1}$ до $10^{-10}$ и вносили в культуру клеток по 200 мкл в каждую лунку. Панели инкубировали при 37°С в термостате в атмосфере 5% $CO_2$ в течение 1 ч, добавляли по 800 мкл поддерживающей среды, состоящей из равных объемов 199 и МЕМ и инкубировали в течение 24–96 ч. Учет результатов проводили микроскопически по наличию или отсутствию цитопатического эффекта по четырехплюсовой системе от + до ++++, где + — поражение 25% клеток, ++ — поражение 50% клеток, +++ — поражение 75% клеток, ++++ — поражение 100% клеток. В качестве контрольных образцов использовались: контроль культуры клеток (среда 199), контроль вируса (вирус+среда 199), контроль токсичности дезинфицирующих растворов (среда 199+дезинфицирующий раствор).

Вирулицидную активность дезинфицирующих растворов определяли путем сравнения инфекционного титра вируса в отсутствии дезинфицирующего раствора (контроль вируса), выраженного в TCID50, с инфекционным титром, определенным после взаимодействия вируса и дезинфицирующего раствора. Результаты исследований показали, что в течение 24–96 ч в суспензии вирус+образец № 1 с разведения$10^{-2}$, в суспензии вирус+образец № 2 с разведения $10^{-3}$ не наблюдалось цитопатического эффекта по сравнению с контрольным образцом (вирус+среда 199), в котором через 96 ч наблюдался цитопатический эффект в разведении $10^{-10}$. В контрольных образцах (контроль культуры клеток, контроли токсичности дезинфектантов) цитопатический эффект не наблюдался.

Эффективность вирулицидного действия дезинфицирующих растворов анолита нейтрального оценивалась также методом иммуноферментного анализа по выявлению антигенов ротавируса в опытных и контрольных образцах с использованием тест-системы иммуноферментной для выявления антигенов ротавирусов «РОТА-АГ» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. К ротавируссодержащей суспензии добавляли равное количество дезинфицирующих растворов, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, готовили 10-кратные разведения суспензий вирус+дезинфицирующий раствор, вирус+среда 199 от $10^{-1}$ до $10^{-5}$ и проводили постановку ИФА в сокращенном варианте: сорбция иммуноглобулина – 30 мин, антигенов – 30 мин, конъюгата — 30 мин. Результаты исследований показали утрату антигенной активности вируссодержащей суспензии, начиная с разведения $10^{-2}$ при использовании образца № 1 и с разведения $10^{-3}$ — после экспозиции с образцом № 2 по сравнению с контрольным образцом (вирус+среда 199).

Таким образом, раствор анолита с pH 6,87 ед, окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП) +950 мВ, содержанием активного хлора (Сах) 200мг/дм$^3$ проявлял выраженную вирулицидную активность в отношении ротавируса человека и по этому критерию может быть рекомендован к использованию при проведении дезинфекционных мероприятий с целью предупреждения распространения РВИ в детских коллективах, включая педиатрические стационары.

Поступили 02.09.2013

## О ПЕРСПЕКТИВЕ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЛАКТОИММУНОГЛОБУЛИНОВ

**Гудков В.Г., Виринская А.С., Бореко Е.И., Рубаник Л.В., Титов Л.П.**

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

Термин «биологические лекарственные средства» (БЛС) имеет различные определения. Под ним понимают группу медицинских продуктов биологического происхождения, в том числе вакцины, препараты крови, аллергены, соматические клетки, ткани, рекомбинантные белки. К ним относятся иммуноглобулины, факторы крови, тромболитические агенты, гормоны, гемопоэтические факторы роста, интерфероны, интерлейкины, вакцины, моноклональные антитела, факторы некроза опухоли, терапевтические ферменты и др. [1].

Согласно внесенному Департаментом фармацевтической промышленности Министерства здравоохранения Республики Беларусь проекту Технического кодекса установившейся практики, гармонизированному с руководством EMEA|CMP|5721|03, БЛС определяется как лекарственное

средство, активной субстанцией которого является биологическое вещество, полученное или выделенное из биологического источника с помощью одного или нескольких биотехнологических методов [2].

БЛС выделяют из целого ряда источников человеческого, животного и микробного происхождения, получают с использованием живых биологических систем, тканей организмов и их производных, средств биотехнологии. Их широко применяют для лечения гематологических, эндокринных, онкологических, заболеваний, заболеваний мочеполовой, костно-мышечной систем, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Эту группу лекарственных средств выделяют в связи со значительным экономическим и медицинским значением входящих в нее препаратов. Объем денежных средств при производстве и реализации БЛС достигает 100 млрд долларов США и, несомненно, будет увеличиваться [1].

Одним из видов БЛС являются специфический в отношении определенных антигенов лактоиммуноглобулин (ЛИГ), получаемый из молозива предварительно иммунизированных этим антигеном коров. Действующей субстанцией ЛИГ являются секреторные иммуноглобулины, которые, в отличие от сывороточных иммуноглобулинов, обладают высокой устойчивостью к протеолитическим ферментам, что позволяет применять их местно и перорально. Попадая на слизистые оболочки органов и тканей, являющиеся входными воротами инфекции, ЛИГ формируют пассивный специфический местный иммунитет и препятствует внедрению возбудителя в клетки, предотвращает развитие патологического процесса или купирует его.

В РНПЦ эпидемиологии и микробиологии разработаны лактоиммуноглобулиновые препараты для лечения и экстренной профилактики распространенных вирусных инфекций — ротавирусной и вирусного гепатита А. Получены экспериментальные серии ЛИГ для клинических испытаний. Сравнительное электрофоретическое исследование ряда иммуноглобулиновых препаратов, в том числе, предназначенных для внутривенного введения, показывает, что ЛИГ не уступают им по качеству. Препараты обладает выраженным противовирусным действием, что подтверждается с помощью лабораторных исследований методом иммуноферментного анализа и реакции нейтрализации вируса в культуре клеток. Успешно проведены доклинические и клинические испытания [3]. Промышленное производство противоротавирусного ЛИГ осваивается отечественным предприятием ООО СП «Фармлэнд».

Вместе с тем возможная область применения этого вида БЛС далеко не исчерпывается названными инфекционными заболеваниями. В настоящее время имеются обоснованные предпосылки для разработки лактоиммуноглобулина для экстренной профилактики и лечения группы острых респираторных инфекций, вызываемых вирусами парагриппа, респираторно-синцитиальным вирусом, аденовирусами, риновирусами. Разработка имеет высокую степень актуальности и социально-экономической значимости. Это определяется двумя основными факторами: существенным доминированием этой группы инфекций в структуре заболеваемости населения острыми респираторными инфекциями (около 80%) и отсутствием специфических лекарственных средств защиты в отношении этих инфекционных заболеваний. Как известно, в настоящее время вакцинация населения осуществляется только против вирусов гриппа, доля которого в общей структуре острых респираторных инфекций не всегда превышает 20%.

Актуальной является также разработка противохламидийного лактоиммуноглобулина, предназначенного для экстренной профилактики и лечения урогенитального хламидиоза. В настоящее время с этой целью используется иммуноглобулин, выделенный из крови человека. Технология производства ЛИГ позволяет получать безопасное лекарственное средство со стандартизованной и более высокой специфической активностью.

Перспективной является и разработка нового БЛС для экстренной профилактики и лечения широко распространенных среди детей острых кишечных инфекций — лактоиммуноглобулин против энтеропатогенных кишечных палочек, стафилококков, сальмонелл, аденовирусов.

Таким образом, БЛС на основе специфических лактоиммуноглобулинов коров могут быть использованы для экстренной профилактики группы кишечных инфекций, энтеровирусной инфекции у детей, осложняющейся менингитом, острых респираторных инфекций, вирусных заболеваний глаз, урогенитальных заболеваний. Специфические препараты ЛИГ используются перорально, путем аппликации на слизистые дыхательных органов и глаз, половых путей. ЛИГ практически безвреден, пригоден для самостоятельного использования и может дополнять или заменять существующие средства профилактики и лечения [3].

Высокая прогнозируемая эффективность и потребность в препаратах ЛИГ, их конкурентоспособность, универсальность технологического процесса производства ЛИГ различной специфичности и его полная локализация, минимальная потребность в экспортных закупках материалов, имеющиеся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии научно-технические заделы, кадровый и технологический потенциал позволяют ставить вопрос о целесообразности создания отечественного производства БЛС, ассоциированного с РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

**Литература**

1. http://ru.wikipedia.org
2. minzdrav.gov.by/dadvfiles/000394_978637_tkp_030201.
3. Лактоиммуноглобулиновые препараты как этиотропные средства для экстренной профилактики и лечения ряда вирусных заболеваний / В.Г. Гудков [и др.] // Здравоохранение. — 2004. — № 10. — С. 68–72.

Поступили 02.09.2013

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С У ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ

**Гурьев В.А., Спыну И.К., Спыну К.И., Дмитриенко В.Д.**

*Национальный Центр Общественного Здоровья, Кишинев, Республика Молдова*

В настоящее время вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекция являются самыми серьезными и широко распространенными вирусными инфекциями, вызывающими значительную заболеваемость и смертность, как во всем мире, так и в Республике Молдова. Коинфекция ВИЧ и вирусных гепатитов является серьезной проблемой для общественного здравоохранения, т. к. эти вирусы действуют синергично, ускоряя процесс повреждения печени у пациентов уже инфицированных вирусами гепатита.

Для оценки заболеваемости вирусными гепатитами В и С у пациентов инфицированных ВИЧ были использованы методы ретроспективного и дескриптивного эпидемиологического анализа. В исследовании были использованы данные из историй болезни пациентов с диагнозом ВИЧ/СПИД выписанных из отделения инфекционных заболеваний Республиканского дерматовенерологического диспансера в период 2003–2009 гг. Были обработаны 2124 историй болезни, из которых были отобраны 574 пациентов тестированных на маркеры HBsAg и анти-HCV.

Полученные результаты показали, что у пациентов, инфицированных ВИЧ, ВГС встречаются чаще в сравнении с ВГВ: у 56,9% обследованных пациентов был выявлен маркер анти-HCV, у 21,2% был выявлен HBsAg. ВГС значительно чаще встречается у пациентов, инфицированных ВИЧ, из группы потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) — 90,6±1,8% от общего количества пациентов данной группы чем среди пациентов инфицированных половым путем — 28,2±2,7% (p=0,01). Данные о заболеваемости вирусным гепатитом В среди ВИЧ-инфицированных говорят о том, что ВГВ среди ПИН (21,9±2,6%) и пациентов, инфицированных половым путем (21,8±2,5%), практически не отличаются. В возрастной структуре пациентов, инфицированных ВИЧ и ассоциированного с ВГС и ВГВ, доля взрослых в интервале 20–49 лет является самым высоким (98%). ВГС встречаются чаще у мужчин (66,9±2,6%) чем у женщин (44,0±3,1%), а данные относительно заболеваемости ВГВ у ВИЧ инфицированных пациентов не выявили статистически значимой разницы между женщинами (24,1±2,4%) и мужчинами (17,6±2,4%). Заболеваемость коинфекцией ВИЧ/ВГС выше в северном и центральном регионах страны. Распространенность вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных выше в южном и центральном регионах Республики Молдова.

В заключении можно отметить что впервые были получены оригинальные результаты о заболеваемости вирусными гепатитами В и С среди ВИЧ инфицированных в зависимости от местности возраста и пола. Полученные результаты дали возможность определить новые эпидемиологические аспекты ВИЧ инфекции ассоциированной с вирусными гепатитами В и С в эндемической зоне, оптимизировать эпиднадзор и усовершенствовать профилактику этих заболеваний. Результаты исследования были внедрены в медицинскую практику путём реализации Национальной Программы по борьбе с вирусными гепатитами В, С и Д на 2012–2016 гг. В перспективе необходимо изучить

клинические, иммунологические и вирусологические аспекты этой проблемы, что крайне необходимо для корректировки тактики лечения и диспансеризации такого рода больных

Поступили 04.09.2013

## ИММУННЫЙ И ОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС У ПАЦИЕНТОВ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ

**Злотникова М.В., Новикова И.А.**

*Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь*

В Республике Беларусь количество больных хронической рецидивирующей герпетической инфекцией (ХРГИ) прогрессивно возрастает и за последнее десятилетие, по данным специалистов, увеличилось приблизительно в 3,5 раза. Существенной причиной складывающейся ситуации является неуклонный рост иммунодепрессивных состояний, формирующихся под влиянием неблагоприятных воздействий среды обитания (радиация, химическое загрязнение воды, почвы, воздуха и других). Как известно, вследствие катастрофы на Чернобыльской АЭС на территорию Беларуси выпало около 70 % радионуклидов. Наиболее пострадавшим регионом оказалась Гомельская область, жители которой продолжают проживать в условиях внешнего и внутреннего хронического ионизирующего облучения.

Работами последних лет показана важнейшая роль свободнорадикальных процессов в функционировании иммунной системы. Через активацию перекисного окисления липидов осуществляется метаболическая регуляция воспаления, пролиферации, регенерации и других клеточных процессов и тем самым обеспечивается формирование полноценных реакций неспецифического и адаптивного иммунитета. С другой стороны, описан иммуносупрессивный эффект оксидативного стресса, проявляющийся в подавлении активности естественных киллеров, продукции растворимых факторов иммунитета (цитокинов и антител), способности Т-лимфоцитов к ответу на митогены.

**Целью** нашей работы было изучение взаимосвязи между состоянием иммунной системы и параметрами липопероксидации у больных ХРГИ тяжелого течения.

Обследовано 37 пациентов (средний возраст 35±12 лет) с тяжелой формой ХРГИ в стадии ремиссии. Продолжительность заболевания варьировала от 3 до 24 лет, частота рецидивов — от 6 до 15 раз в год. Определяли субпопуляции лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител линии IOTest (Beckman Coulter, USA) на трехцветном проточном цитофлуориметре («PAS», Partec). Функциональную активность нейтрофилов оценивали по способности к поглощению *Staphylococcus aureus* (реакция фагоцитоза) и продукции активных форм кислорода (реакция спонтанного и стимулированного *Staphylococcus aureus* восстановления нитросинего тетразолия — НСТ-тест). Состояние гуморального звена иммунитета характеризовали по содержанию иммуноглобулинов A, M, G (иммунотурбиди-метрически на анализаторе «Architec C8000») и циркулирующих иммунных комплексов (преципитация полиэтиленгликолем) в сыворотке крови. Оксидантный статус оценивали по содержанию первичных (диеновые конъюгаты — ДК), промежуточных (кетодиены и сопряженные триены — КД/СТ) и конечных (основания Шиффа — ОШ) продуктов липопероксидации в гептанизопропанольных экстрактах плазмы и эритроцитов. Состояние антиоксидантной защиты характеризовали по содержанию церулоплазмина в плазме, активности каталазы и супероксиддисмутазы в эритроцитах. Контрольную группу составили 26 здоровых лиц сопоставимого возраста.

Результаты обработаны статистически с применением непараметрических методов — критерий Манна–Уитни и корреляционный анализ по Спирмену. Различия считали значимыми при $p<0,05$.

Выявлено достоверное увеличение относительного количества $CD3^+CD4^+$-лимфоцитов с одновременным повышением соотношения $CD4^+/CD8^+$ у обследованных больных в сравнении со здоровыми лицами ($p=0,001$; $p=0,0002$). Отмечалось также повышение базальной активности нейтрофилов (НСТ-спонтанный) в 2,6 раза по сравнению с контрольными значениями ($p=0,0001$) и снижение ($p=0,0001$) резервной активности нейтрофилов (разность между значениями базально-

го и стимулированного теста). Значимых изменений показателей гуморального звена иммунитета у больных ХРГИ не отмечалось.

Несмотря на то, что больные ХРГИ обследованы в период ремиссии заболевания, нами выявлены признаки активации перекисного окисления липидов: увеличение содержания ДК и ОШ в гептановом экстракте плазмы (p=0,03; p=0,003 соответственно), а также КД/СТ и ОШ в изопропанольном экстракте эритроцитов (p=0,005 и p=0,00004). Одновременно со стимуляцией перекисного окисления липидов наблюдалась активация антиоксидантной защиты: содержание церулоплазмина в плазме, активность эритроцитарной каталазы и супероксиддисмутазы были значимо выше по сравнению с контрольными значениями (p=0,003, p=0,001 и p=0,004).

При оценке взаимосвязей между параметрами липопероксидации и иммунного статуса обнаружена отрицательная корреляция между содержанием ДК в гептановом экстракте плазмы и количеством $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов (r=-0,81; p=0,02), положительная взаимосвязь между уровнем изопропанол-экстрагируемых ДК плазмы и соотношением $CD4^+/CD8^+$ лимфоцитов (r=0,79; p=0,036), а также между гептан-экстрагируемыми ОШ плазмы и концентрацией IgA (r=0,89; p=0,018).

Таким образом, у пациентов с ХРГИ в период клинической ремиссии заболевания отмечаются реактивные изменения иммунного и оксидантного статусов, что может являться свидетельством непрерывно протекающего латентного воспалительного процесса.

Поступили 04.09.2013

## THE RESULT OF THE IMPLEMENTATION EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE SYSTEM AND CONTROL AND RESPONSE MEASURES TU INFLUENZA, ACUTE VIRAL RESPIRATORY INFECTIONS (ARI) AND SEVERE ACUTE RESPIRATORY INFECTION (SARI)

**Spînu C., Scoferţa P., Cojocaru R., Eder V., Spînu I., Guriev V., Gheorgita S.**

*National Center for Public Health, Chisinau, Republic of Moldova*

The health system of the Republic of Moldova has a nominated infections surveillance system, developed with the support of the World Bank and adjusted to the requirements of WHO, ECDC and CDC, which is connected to the European network EuroFlu and global FluNet WHO influenza surveillance, ARI and SARI. This system includes the National Influenza Center accredited by WHO, a biosafety level BSL-2 and BSL-2 +, with modern equipment, supplies and qualified personnel able to perform the techniques of classical virology and molecular biology. Exploring the epidemiological surveillance system for influenza during 2012 (week 40) — 2013 (week 12) made it possible to highlight: extensive spreading, medium intensity 12,770/0000, apogee at week 08/2013, the trend of increas and discreas respectively 2.8 0/0000 and 2,24 0/0000 Influenza morbidity was included within weeks 04/2013–12/2013, identified viruses: A (H1N1) pdm, A (H3N2) and B dominant strain A ( H1N1)pdm (51.44%), the rate of positive samples during apogee, increas and discreas, was 48.8, 58.5 and 47.7% respectively, were mostly affected person aged 15–64 years (63.2%) and children 0–14 years (32.0%). Categories of pregnant women and patients with immunocompromised status with confirmed influenza were 22.1% and 22.5%, respectively. ARI morbidity in apogee period was 468,60/0000 and reached epidemic threshold 189,70/0000 and by SARI — 76,6 0/0000 increased compared to the same period of last season – 48,30/0000. Control and response measures: making epidemiological surveillance based on specific and nonspecific indicators allowed to vaccinate about 100 000 at-risk population, predict in real time the evolution of influenza morbidity, health system impact assessment, then appreciated as moderate, confirm clinical biodiagnostical influenza, arguing the need for initiation of therapy avoid severe postinfluenza complications, appreciating that Oseltamivir and Zanamivir sensitive influenza virus strains identified, demonstrating isolated strains belonging and place global phylogenetic tree and argue the need to extend the at-risk population for immunization with vaccine recommended by WHO for the season 2013–2014.

Поступили 04.09.2013

## Именной указатель


**А**

*Абрамович М.Л.* 285
*Адекенов С.М.* 121
*Азарова И.А.* 106, 181
*Алексеев А.Н.* 8
*Алексейчик Д.С.* 287
*Амвросьева Т.В.* 12, 65, 114, 123, 161
*Андреев В.П.* 273
*Анищенко Е.В.* 21
*Артюшевская М.В.* 165
*Астапов А.А.* 82
*Асташонок А.Н.* 290, 311

**Б**

*Бабаев С.Ю.* 213
*Бабенко А.С.* 49, 165
*Бадыгина Н.А.* 245
*Бакаева Т.Н.* 141
*Балашова Е.П.* 61
*Батян Г.М.* 296
*Белановская Л.И.* 141
*Березин В.Э.* 121
*Блатун Е.М.* 55
*Богданов Ю.А.* 306
*Богданова Н.Л.* 118
*Богоявленский А.П.* 121
*Богуш З.Ф.* 12, 65, 114, 123
*Бореко Е.И.* 353
*Борисевич С.И.* 87
*Булдык Е.А.* 296
*Бурак И.И.* 352
*Бутько Л.В.* 328

**В**

*Вайханская Т.Г.* 123
*Васильева М.А.* 302
*Васылышин З.П.* 24
*Веденьков А.Л.* 78
*Верещако Н.С.* 311
*Вершинина С.И.* 298
*Виноград Н.А.* 24, 29, 33
*Винничек Л.А.* 147
*Виринская А.С.* 36, 44, 352, 353
*Владыко А.С.* 122, 251, 265
*Волкова Л.В.* 300
*Воропаев Е.В.* 216
*Выговская О.В.* 314

**Г**

*Гаврилова И.А.* 134
*Газиумарова Л.Д.* 141
*Гасич Е.Л.* 105
*Глаз О.Ч.* 258
*Глинская И.Н.* 36, 44
*Гмыль А.П.* 249
*Головнева Г.П.* 87
*Гончаров А.Е.* 240, 270, 336
*Гончарова А.И.* 144
*Горбунов В.А.* 3, 147, 152
*Горовиц Э.С.* 262
*Грибкова Н.В.* 42, 96
*Гудков В.Г.* 36, 44, 352, 354
*Гудкова Е.И.* 258
*Гуль Л.М.* 123
*Гурьев В.А.* 355

**Д**

*Дашкевич А.М.* 36, 44, 65
*Дашукевич Л.И.* 147
*Девятникова В.А.* 265
*Дедюля К.Л.* 12, 65, 114, 161
*Деев В.В.* 314
*Дмитраченко Т.И.* 204, 302, 352
*Дмитриенко В.Д.* 355
*Докукина Т.В.* 175
*Дубинина Е.В.* 8
*Дуйсенбаев Н.К.* 121
*Думова С.А.* 87
*Дюсьмикеева М.И.* 348

**Е**

*Еремин В.Ф.* 105
*Ермакова Т.С.* 147, 152
*Ермолович М.А.* 49, 52, 80, 82, 87, 92, 165,249

**Ж**

*Жаворонок С.В.* 216
*Жавнерко Г.К.* 175
*Жанымханова П.Ж.* 121
*Жильцов И.В.* 302
*Журавлев Р.В.* 213

**З**

*Задорожная Н.Н.* 87
*Залевская О.С.* 78, 103
*Земко В.Ю.* 326
*Землянский В.А.* 170
*Зенькова С.К.* 302
*Злотникова М.В.* 356
*Зуева В.Л.* 12

**И**

*Иванова О.Е.* 249

**К**


*Кабанова А.А.* 237
*Казинец О.Н.* 65, 114
*Казначеева Е.П.* 21
*Капитулец Н.Н.* 175, 181
*Капитулец С.П.* 170, 175, 181
*Карабан И.А.* 152
*Кармазин В.В.* 21
*Карпов И.А.* 52
*Карпунина Т.И.* 306
*Квачева З.Б.* 311
*Кирилюк О.Д.* 326
*Клименкова Ю.Г.* 230
*Климович О.В.* 78, 103
*Клюйко Н.Л.* 65
*Князева О.Р.* 265, 311
*Козак Л.П.* 24
*Колодкина В.Л.* 54, 56
*Коломиец Н.Д.* 279
*Комаренко Н.С.* 29
*Корнилов А.В.* 230
*Костюк С.А.* 245
*Крамарев С.А.* 314
*Красавцев Е.Л.* 21, 187
*Красько А.Г.* 118, 265
*Кроткова Е.Н.* 300
*Крушинская Т.Г.* 87
*Крылова Е.В.* 204
*Кубраков К.М.* 302
*Курятников А.Г.* 58
*Кучко Е.В.* 44


**Л**


*Лагун Л.В.* 193
*Лапо Т.П.* 41
*Лебедев Ф.А.* 152, 199
*Левченя М.В.* 320, 336
*Левшина Н.Н.* 141, 152
*Леонова Е.Ю.* 165
*Лосева Е.М.* 87
*Ляховская Н.В.* 204, 352


**М**


*Мартынов В.С.* 54, 56
*Матиевская Н.В.* 273
*Матус О.В.* 92
*Махров М.В.* 175
*Мацкевич Е.А.* 230
*Мельников В.Л.* 61, 213
*Мельникова Е.И.* 3
*Митрофанова Н.Н.* 61, 213
*Мишаева Н.П.* 265
*Мицура В.М.* 216
*Мукушева Г.К.* 121


**Н**


*Нашкевич Н.Н.* 221
*Николаева Н.В.* 306
*Ничипорук О.И.* 175, 181
*Новацкая Ю.В.* 36
*Новикова И.А.* 356
*Носова Е.С.* 226


**О**


*Окулич В.К.* 144, 230, 237, 326
*Осипкина О.В.* 216


**П**


*Павлов К.И.* 328
*Паплевка Т.В.* 348
*Парибок И.В.* 175
*Перова А.В.* 306
*Петкевич А.С.* 3, 118
*Петренко Т.С.* 298
*Плоскирева А.А.* 233, 285
*Плотников Ф.В.* 237
*Плотникова К.Ю.* 44
*Поклонская Н.В.* 12, 65, 114, 161
*Полещук Н.Н.* 290, 311
*Полуян О.С.* 245
*Прищепенко В.А.* 345
*Прищепенко О.А.* 345
*Прудников А.Р.* 230


**Р**


*Рогачева Т.А.* 141
*Романова И.В.* 240, 270


**С**


*Савкина М.А.* 144
*Самойлова Т.И.* 71, 78, 103
*Самойлович Е.О.* 49, 52, 80, 82, 87, 92, 165, 249, 277
*Сапко Т.Г.* 287
*Сачилович Д.С.* 298
*Светогор Т.Н.* 36
*Свирчевская Е.Ю.* 52, 80, 82, 87, 92, 249
*Севрукевич В.И.* 123
*Семейко Г.В.* 49, 52, 80, 82, 87, 92, 249
*Семенов В.М.* 204, 302, 352
*Семижон П.А.* 129, 251, 265
*Сивец Н.В.* 42, 96
*Синюк К.В.* 99
*Скальская Н.И.* 33
*Скороход Г.А.* 258
*Скрягин А.Е.* 270
*Скрягина Е.М.* 270
*Слизень В.В.* 255, 258

*Соглаева А.А.* *78, 103*
*Соколова Е.А.* *262*
*Соколова Н.С.* *121*
*Солодовникова В.В.* *270*
*Сосинович С.В.* *105*
*Спринджук М.В.* *336*
*Спыну И.К.* *355*
*Спыну К.И.* *355*
*Стрижак Ю.В.* *296*
*Счесленок Е.П.* *129, 251, 265*

**Т**

*Тапальский Д.В.* *193*
*Терешков Д.В.* *216*
*Титов Л.П.* *99, 134, 141, 147, 152,199, 226, 240, 270, 320 , 328, 336, 348, 353*
*Томсон М.* *105*
*Турмагамбетова А.С.* *121*

**Ф**

*Федорович Е.В.* *141*
*Фидаров Ф.М.* *181*
*Филипенок С.С.* *141*
*Фомина Е.Г.* *129, 251*
*Фрейнд Г.Г.* *262*

**Х**

*Хныков А.М.* *352*
*Ходин Д.В.* *65*

**Ц**

*Цеханович Н.С.* *87*
*Циркунова Ж.Ф.* *258*
*Цыркунов В.М.* *273*

**Ч**

*Черновецкий М.А.* *49*
*Чешенок Е.В.* *42*

**Ш**

*Шиманович В.П.* *80, 277*
*Шишко Г.А.* *165*
*Школина Т.В.* *129, 251*
*Шмелева Н.Д* *279*
*Шмелева Н.П.* *3*
*Шпаковская Н.С.* *270, 348*
*Шумовец В.В.* *123*

**Щ**

*Щучинова Л.Д.* *108*

**Ю**

*Юпатов Г.И.* *345*

**Я**

*Янович О.О.* *348*
*Ясинская Л.И.* *82*
*Яшкова С.Е.* *78*

**C**

*Cojocaru R.* *357*

**E**

*Eder V.* *357*

**G**

*Gheorgita S.* *357*
*Guriev V.* *357*

**K**

*Karapetyan K.J.* *208*
*Khachatryan T.V.* *208*
*Khanjyan G.J.* *208*

**M**

*Melik-Andreasyan G.G.* *208*

**S**

*Scoferţa P.* *357*
*Spînu C.* *357*
*Spînu I.* *357*

**T**

*Tkhruni F.N.* *208*
*Tsakanyan A.V.* *208*

## 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, без установки автоматического переноса, все поля по 25 мм.

3. Объем статьи, включая рисунки, таблицы, библиографический список литературы 5–7 страниц формата А4, научных обзоров — до 12 страниц.

4. Статья должна быть изложена на русском или английском языке для иностранных авторов.

5. Заглавие статьи печатается с выравниванием по центру без точек в конце и включает:

1) **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ — ПЕЧАТАЕТСЯ ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ БЕЗ СОКРАЩЕНИЙ ЖИРНЫМ ШРИФТОМ;**

2) **фамилии и инициалы авторов — указываются ниже строчными буквами жирным шрифтом;**

3) *название учреждения, город, страна — указываются на следующей строке курсивом нежирным шрифтом*.

6. После заглавия (на языке текста публикуемого материала) через пустую строку 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 «материал 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 названия, отделенного от номера знаком тире. Заголовок следует помещать над таблицей слева, без абзацного отступа. Использование страниц альбомного формата не допускается.

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, отделяя знаком тире номер от наименования. Точку в конце нумерации и наименований иллюстраций не ставят. 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), для обзорной статьи (не более 25), оформленный в соответствии с ГОСТ 7.1.-2003 «Библиографическое описание документа», , 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 приводиться на русском языке). Буквального соответствия русского и английского рефератов не требуется.

13. В конце статьи должны быть подписи всех авторов.

14. К статье прилагаются сведения об авторах (Ф.И.О., звание, ученая степень, должность, учреждение, город, адрес электронной почты и контактный телефон).

15. Обязательно предоставление материалов в электронном виде с соблюдением вышеуказанных правил. Файл должен иметь формат MS Word (*.DOC, *.RTF). Название файла должно содержать фамилию и инициалы первого автора и первые два слова названия статьи на русском языке (например, Сидров ИИ_Способ получения.doc).

16. Статья должна быть тщательно отредактирована и выверена автором. Обязательна виза руководителя подразделения. К статье прилагается экспертное заключение о возможности опубликования в открытой печати, и письмо-ходатайство организации, в которой выполнялась работа, с обязательным указанием, что направляемые материалы ранее не были опубликованы или не приняты к печати другими изданиями (авторы несут за это полную ответственность).

17. Один автор имеет право на публикацию не более трех научных статей с учетом соавторства.

18. Лицам, осуществляющим послевузовское обучение (аспирантура, докторантура, соискательство) в год завершения обучения предоставляется первоочередная возможность опубликования представленных статей.

19. Поступившие в редакцию статьи направляются на рецензирование профильным специалистам. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи. Если по рекомендации рецензента статья возвращается на доработку, то переработанная рукопись вновь рассматривается редакционной коллегией, при этом датой поступления считается день получения редакцией ее окончательного варианта.

20. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи без искажения основного содержания статьи.

21. При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются. Рукописи не возвращаются.

**Плата за опубликование научных статей не взимается со всех авторов.**

**Адрес и контактная информация редакции:**

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии,
ул. Филимонова, 23, г. Минск, 220114, Республика Беларусь
Телефоны: (+375-17) 263 64 68; 237 69 79
Факс: (+375-17) 267 30 93
Электронная почта: rrpcem@belriem.by или belriem@gmail.com ,http://www.belriem.by/

## СОДЕРЖАНИЕ

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ПО БОРЬБЕ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
*Горбунов В.А., Мельникова Е.И., Петкевич А.С., Шмелева Н.П.* .....3

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ .....8**

ОСОБЕННОСТИ ФАУНЫ КЛЕЩЕВЫХ ПАТОГЕНОВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В ПАРКАХ МЕГАПОЛЮСОВ И ФАКТОРЫ ИХ ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ
*Алексеев А.Н., Дубинина Е.В.* .....8

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
*Амвросьева Т.В., Зуева В.Л., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Дедюля К.Л.* .....12

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С БЫСТРЫМ ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ
*Анищенко Е.В., Красавцев Е.Л., Кармазин В.В., Казначеева Е.П.* .....21

ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ МОНИТОРИНГА СОЧЕТАННЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ
*Виноград Н.А., Васылышин З.П., Козак Л.П.* .....24

КЛЕЩЕВЫЕ ТРАНСМИССИВНЫЕ ИНФЕКЦИИ В КИЕВСКОЙ ОБЛАСТИ
*Виноград Н.А., Комаренко Н.С.* .....29

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГОСПИТАЛЬНОГО НАДЗОРА ЗА КОКСИЕЛЛЕЗОМ
*Виноград Н.А., Скальская Н.И.* .....33

РОТАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И СИСТЕМА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА В Г. МИНСКЕ
*Глинская И.Н., Виринская А.С., Дашкевич А.М., Новацкая Ю.В., Светогор Т.Н., Гудков В.Г.* .....36

ТЯЖЕЛЫЕ ОСТРЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ ПО ГРИППУ 2010–2013 ГГ. В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
*Грибкова Н.В., Лапо Т.П., Чешенок Е.В., Сивец Н.В.* .....42

ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ А В Г. МИНСКЕ: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА
*Гудков В.Г., Глинская И.Н., Дашкевич А.М., Виринская А.С., Кучко Е.В., Плотникова К.Ю.* .....44

ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ПАРВОВИРУСА В19 НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ В ПЕРИОД 2005–2012 гг.
*Ермолович М.А., Семейко Г.В., Самойлович Е.О., Бабенко А.С., Черновецкий М.А.* .....49

ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА КОРИ ГЕНОТИПА В3 НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ
*Ермолович М.А., Семейко Г.В, Свирчевская Е.Ю., Самойлович Е.О., Блатун Е.М., Карпов И.А.* ...52

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ КОКЛЮШНОГО ТОКСИНА И ПЕРТАКТИНА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *BORDETELLA PERTUSSIS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ В БЕЛАРУСИ
*Колодкина В.Л., Мартынов В.С.* .....54

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО КОКЛЮШУ В БЕЛАРУСИ В 2012 г.
*Колодкина В.Л., Мартынов В.С.* .....56

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАКРЫТОМ КОЛЛЕКТИВЕ
*Курятников А.Г.* .....58

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОКИ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ
*Мельников В.Л., Митрофанова Н.Н., Балашова Е.П.* .....61

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ НОРОВИРУСОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
*Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В., Дедюля К.Л., Ходин Д.В., Дашкевич А.М., Клюйко Н.Л., Богуш З.Ф., Казинец О.Н.* .....65

АРБОВИРУСЫ И АРБОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ
*Самойлова Т.И.* .....71

ЗАРАЖЕННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В БЕЛАРУСИ ЗА ПОСЛЕДНИЕ ДВА ГОДА
*Самойлова Т.И., Залевская О.С., Климович О.В., Соглаева А.А., Яшкова С.Е., Веденьков А.Л.* .....78

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2013 И 2012 гг.
*Самойлович Е.О., Шиманович В.П., Семейко Г.В., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А.* .....80

НАДЗОР ЗА ОСТРЫМИ ВЯЛЫМИ ПАРАЛИЧАМИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ. 2011–2013 гг.
*Свирчевская Е.Ю., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Семейко Г.В., Ясинская Л.И., Астапов А.А.* .....82

РЕЗУЛЬТАТЫ НАДЗОРА ЗА ЦИРКУЛЯЦИЕЙ ПОЛИОВИРУСОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, 2011–2012 гг.
*Свирчевская Е.Ю., Самойлович Е.О., Ермолович М.А., Семейко Г.В., Борисевич С.И., Головнева Г.П., Думова С.А., Крушинская Т.Г., Цеханович Н.С., Лосева Е.М., Задорожная Н.Н.* .....87

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РОТАВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР: ВОЗМОЖНОСТИ, ПРОБЛЕМЫ, ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ
*Семейко Г.В., Ермолович М.А., Свирчевская Е.Ю., Матус О.В., Самойлович Е.О.* .....92

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БОКАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
*Сивец Н.В., Грибкова Н.В.* .....96

ГЕНОМНЫЕ ПРЕДПОСЫЛКИ КОНКУРЕНТНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГИПЕРИНВАЗИВНЫХ ЛИНИЙ *NEISSERIA MENINGITIDIS*
*Синюк К.В., Титов Л.П.* .....99

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА В КРОВОСОСУЩИХ КОМАРАХ И МОШКАХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 2011–2012 гг.
*Соглаева А.А., Самойлова Т.И., Климович О.В., Залевскоя О.С., Азарова И.А.* .....103

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ГЕНОМА УНИКАЛЬНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ВИЧ-1, ВЫЯВЛЕННОЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
*Сосинович С.В., Еремин В.Ф., Гасич Е.Л., Томсон М.* .....105

ЗАРАЖЕННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ПОЛИДОМИНАНТНЫХ ОЧАГАХ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ
*Щучинова Л.Д.* .....108

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА .....114**

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ЭНТЕРОВИРУСОВ
*Амвросьева Т.В., Казинец О.Н., Дедюля К.Л., Богуш З.Ф., Поклонская Н.В.* .....114

АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ ДЕНГЕ
*Богданова Н.Л., Рустамова Л.М., Красько А.Г., Петкевич А.С.* .....118

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ПИНОСТРОБИНА И ТЕКТОХРИЗИНА
*Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Соколова Н.С., Жанымханова П.Ж., Дуйсенбаев Н.К., Мукушева Г.К., Адекенов С.М., Березин В.Э.* .....121

ПАРВОВИРУС В19 — ОСНОВНОЙ ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ СЕГОДНЯ ИЛИ «СВИДЕТЕЛЬ» ЗАБОЛЕВАНИЯ?
*Вайханская Т.Г., Гуль Л.М., Шумовец В.В., Севрукевич В.И., Богуш З.Ф., Амвросьева Т.В.* .....123

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ, ОСНОВАННЫХ НА МЕТОДЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА, НА ПРИМЕРЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК ЛАССА, МАРБУРГ И ЭБОЛА
*Владыко А.С., Счесленок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Фомина Е.Г.* .....129

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЗАИМОСВЯЗЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ/ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS* К АНТИБИОТИКАМ И ДЕЗИНФЕКТАНТАМ
*Гаврилова И.А., Титов Л.П.* .....134

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ
*Газиумарова Л.Д., Титов Л.П., Бакаева Т.Н., Левшина Н.Н., Рогачева Т.А., Белановская Л.И., Филипенок С.С., Федорович Е.В.* .....141

ЭЛАСТАЗНАЯ И БАПНА-АМИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ
*Гончарова А.И., Окулич В.К., Савкина М.А.* .....144

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
*Горбунов В.А., Ермакова Т.С., Титов Л.П., Винничек Л.А, Дашукевич Л.И.* .....147

МОНИТОРИНГ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ СРЕДСТВАМ КАК ЭЛЕМЕНТ СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА И КЛЮЧЕВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ЕВРОПЕЙСКОГО СТРАТЕГИЧЕСКОГО ПЛАНА ДЕЙСТВИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ
*Титов Л.П., Давыдов А.В., Горбунов В.А., Ермакова Т.С., Лебедев Ф.А., Левшина Н.Н., Карабан И.А.* .....152

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ИНДИКАЦИИ КИШЕЧНЫХ ВИРУСОВ В ОБЪЕКТАХ ПИТЬЕВОГО ВОДОСНАБЖЕНИЯ
*Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В.* .....161

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ НЕИММУННОЙ ВОДЯНКИ ПЛОДА, ВЫЗВАННОЙ ПАРВОВИРУСОМ В19
*Ермолович М.А., Леонова Е.Ю., Шишко Г.А., Артюшевская М.В., Бабенко А.С., Самойлович Е.О.* .....165

ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ
*Землянский В.А., Капитулец С.П.* .....170

ПРИЖИЗНЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТЕАЗОУСТОЙЧИВОГО КОМПОНЕНТА ПРИОННОГО БЕЛКА ВО ФРАКЦИЯХ МЕМБРАН КОМПОНЕНТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НЕЯСНОГО ГЕНЕЗА
*Капитулец С.П., Жавнерко Г.К., Ничипорук О.И., Парибок И.В., Капитулец Н.Н., Махров М.В., Докукина Т.В.* .....175

РОЛЬ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В ГУМОРАЛЬНОМ ОТВЕТЕ ПРОТИВ ЛЕПТОСПИРОЗА У ЧЕЛОВЕКА: ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУННОГО БЛОТТИНГА ПРИ СЕРОДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ
*Капитулец С.П., Ничипорук О.И., Капитулец Н.Н., Азарова И.А., Фидаров Ф.М.* .....181

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТАМИ ИНТЕРФЕРОНОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С
*Красавцев Е.Л.* .....187

ОЦЕНКА ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПИЕЛОНЕФРИТОВ И ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ УРОПАТОГЕНОВ
*Лагун Л.В., Тапальский Д.В.* .....193

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПЦР ДЛЯ СЕРОТИПИРОВАНИЯ *NEISSERIA MENINGITIDIS* ПО ШЕСТИ СЕРОГРУППАМ: A, B, C, Y, W135 И 29E
*Лебедев Ф.А., Титов Л.П.* .....199

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ СМЕШАННЫХ РОТАВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ У ДЕТЕЙ
*Ляховская Н.В., Дмитраченко Т.И., Семенов В.М., Крылова Е.В.* .....204

EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF HUMAN GUT MICROBIOTA PATHOGENS
*Melik-Andreasyan G.G.,Tkhruni F.N., Tsakanyan A.V., Karapetyan K.J., Khanjyan G.J. ,Khachatryan T.V.* .....208

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОТДЕЛЕНИИ ТОРАКАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ
*Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л., Бабаев С.Ю., Журавлев Р.В.* .....213

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-28В ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С И ВЛИЯНИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОГО ЛЕЧЕНИЯ
*Мицура В.М., Воропаев Е.В., Жаворонок С.В., Осипкина О.В., Терешков Д.В.* .....216

АЛЬФА-ДЕФЕНЗИНЫ — МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ НЕЙТРОФИЛОВ: РОЛЬ В ВОСПАЛЕНИИ И ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА
*Нашкевич Н.Н.* .....221

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ САЛЬМОНЕЛЛ КАК ВАЖНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЭПИДНАДЗОРА ЗА КЛИНИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ
*Носова Е.С., Титов Л.П.* .....226

ЭЛАСТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА И СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ
*Окулич В.К., Прудников А.Р. Корнилов А.В., Клименкова Ю.Г., Мацкевич Е.А.* .....230

СТУПЕНЧАТАЯ ДИЕТОТЕРАПИЯ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ
*Плоскирева А.А.* .....233

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ЕЕ СВЯЗЬ С ФОРМИРОВАНИЕМ БИОПЛЕНКИ
*Плотников Ф.В., Окулич В.К., Кабанова А.А.* .....237

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ТОЛЕРОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ
*Романова И.В., Гончаров А.Е., Титов Л.П.* .....240

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM* МЕТОДОМ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
*Руденкова Т.В., Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Полуян О.С.* .....245

НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫЕ КИШЕЧНЫЕ ВИРУСЫ,
ВЫДЕЛЕННЫЕ В РАМКАХ НАДЗОРА ЗА ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С СИНДРОМОМ
ОСТРОГО ВЯЛОГО ПАРАЛИЧА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
*Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Ермолович М.А., Семейко Г.В., Иванова О.Е., Гмыль А.П.* ..249

ПОЛУЧЕНИЕ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЙ ЭКСПРЕССИЮ
ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА ВИРУСА ЭБОЛА
*Семижон П.А., Счесленок Е.П., Школина Т.В., Фомина Е.Г., Владыко А.С.* .....251

ДЕТЕКЦИЯ МЕТОДОМ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ
МУТАЦИЙ В 90 И 91 КОДОНАХ GYRA ГЕНА, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ
К ФТОРХИНОЛОНАМ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
*Слизень В.В.* .....255

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРОНЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ
У ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОВ
*Слизень В.В., Циркунова Ж.Ф., Гудкова Е.И., Скороход Г.А., Глаз О.Ч.* .....258

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ ПРЯМОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИУТРОБНЫХ ПНЕВМОНИЙ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ
*Соколова Е.А., Горовиц Э.С., Фрейнд Г.Г.* .....262

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ
ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ УЧАСТКИ ГЕНОМОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА: ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗА И АНАПЛАЗМОЗА
*Счесленок Е.П., Семижон П.А., Князева О.Р.,*
*Девятникова В.А., Мишаева Н.П., Красько А.Г., Владыко А.С.* .....265

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ
СО МНОЖЕСТВЕННОЙ И ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ
*Титов Л.П., Гончаров А.Е., Скрягина Е.М., Шпаковская Н.С.,*
*Скрягин А.Е., Романова И.В., Солодовникова В.В.* .....270

ФИКСАЦИЯ БИОПТАТОВ ПЕЧЕНИ
*Андреев В.П., Цыркунов В.М., Матиевская Н.В.* .....273

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПАРОТИТОМ В ЕВРОПЕЙСКОМ РЕГИОНЕ
*Шиманович В.П., Самойлович Е.О.* .....277

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОБОЧНЫХ РЕАКЦИЙ
НА ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИН НАЦИОНАЛЬНОГО КАЛЕНДАРЯ
ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРИВИВОК
*Шмелева Н.Д., Коломиец Н.Д.* .....279

**ИМУННЫЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
И ИХ ИММУНОПРОФИЛАКТИКА .....285**

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
*Абрамович М.Л., Плоскирева А.А.* .....285

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА У ПАЦИЕНТОВ
С ХЛАМИДИЙИНДУЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ГЛАЗ
*Алексейчик Д.С., Сапко Т.Г.* .....287

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ КОРРЕЛЯТЫ ПЕРСИСТЕНТНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ
ИНФЕКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ МЫШЕЙ BALB/C
ШТАММОМ *C. TRACHOMATIS* (СЕРОВАР D)
*Асташонок А.Н., Рубаник Л.В., Полещук Н.Н.* .....290

ПАТОЛОГИЯ СЕРДЦА, ВЫЯВЛЕННАЯ НА ФОНЕ
ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ
*Батян Г.М., Булдык Е.А., Стрижак Ю.В.* .....296

ПАРАМЕТРЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ИНФЕКЦИЯХ
*Вершинина С.И., Петренко Т.С., Сачилович Д.С.* .....298

ПСИХОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВНУТРЕННЕЙ КАРТИНЫ БОЛЕЗНИ
ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С
*Волкова Л.В., Кроткова Е.Н.* .....300

БЕТА-ЛАКТАМАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИКВОРА И ЕЕ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
*Жильцов И.В., Семенов В.М., Зенькова С.К., Васильева М.А., Дмитраченко Т.И., Кубраков К.М.* ..302

СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ *ENTEROCOCCUSFAECALIS*
В ПРИСУТСТВИИ СПЕРМАЛЬНЫХ ПОЛИАМИНОВ
*Карпунина Т.И., Николаева Н.В., Перова А.В., Богданов Ю.А.* .....306

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИСТООБРАЗОВАНИЯ СПИРОХЕТ *BORRELIA BURGDORFERI*
НА ПРИМЕРЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК АСТРОГЛИИ
*Князева О.Р., Асташонок А.Н., Верещако Н.С., Квачева З.Б., Полещук Н.Н.* .....311

ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПРИ ВЕТРЯНОЙ ОСПЕ У ДЕТЕЙ
*Крамарев С.А., Деев В,В., Выговская О.В.* .....314

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕСИИ ГЕНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИЗАТОВ КУЛЬТУР *S. AUREUS*, *CANDIDA ALBICANS*
И *STR. PYOGENES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОЖНЫХ БЛЯШЕК ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ
*Левченя М.В., Титов Л.П.* .....320

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ
ПО СПОСОБНОСТИ РАЗРУШАТЬ ПЕПТИДОГЛИКАН У ПАЦИЕТОВ
С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
*Окулич В.К., Земко В.Ю., Кирилюк О.Д.* .....326

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ-ИНДУКТОРОВ СОМАТИЧЕСКИХ ГИПЕРМУТАЦИЙ
В СПЛЕНОЦИТАХ МЫШЕЙ ЛИНИИ CB57/BL, АМНИОТИЧЕСКОЙ
И АЛЛАНТОИСНОЙ ЖИДКОСТИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ
*Павлов К.И., Титов Л.П., Бутько Л.В.* .....328

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КУЛЬТУРОЙ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК
ПРИ ПРАЙМИРОВАНИИ И СОЗРЕВАНИИ МЕТОДОМ ДНК-МАТРИЦЫ
*Титов Л.П., Гончаров А.Е., Левченя М.В., Спринджук М.В.* .....336

ТРИПСИНОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ
ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ
*Юпатов Г.И., Прищепенко В.А., Прищепенко О.А.* .....345

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ИЛ-1
У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПЛЕВРИТОМ И ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ
*Янович О.О., Титов Л.П., Дюсьмикеева М.И., Шпаковская Н.С., Паплевка Т.В.* .....348

**ТЕЗИСЫ НАУЧНЫХ СТАТЕЙ .....352**

ВИРУЛИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА
«АНОЛИТ НЕЙТРАЛЬНЫЙ» В ОТНОШЕНИИ РОТАВИРУСОВ
*Виринская А.С., Гудков В.Г., Ляховская Н.В., Дмитраченко Т.И., Семенов В.М., Бурак И.И., Хныков А.М.* .....352

О ПЕРСПЕКТИВЕ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЛАКТОИММУНОГЛОБУЛИНОВ
*Гудков В.Г., Виринская А.С., Бореко Е.И., Рубаник Л.В., Титов Л.П.* .....353

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С
У ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ
*Гурьев В.А., Спыну И.К., Спыну К.И., Дмитриенко В.Д.* .....355

ИММУННЫЙ И ОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС У ПАЦИЕНТОВ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ
ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ
*Злотникова М.В., Новикова И.А.* .....356

THE RESULT OF THE IMPLEMENTATION EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE SYSTEM
AND CONTROL AND RESPONSE MEASURES TU INFLUENZA, ACUTE VIRAL RESPIRATORY
INFECTIONS (ARI) AND SEVERE ACUTE RESPIRATORY INFECTION (SARI)
*Spînu C., Scoferţa P., Cojocaru R., Eder V., Spînu I., Guriev V., Gheorgita S.* .....357

**ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ .....358**

**ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ .....361**

Подготовлено по заказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Научное издание

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Сборник научных трудов

Выпуск 6

Главный редактор: чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. Л.П. Титов

Ответственный редактор: д-р мед. наук, проф. А.С. Владыко

Редакторы: Е.И. Мельникова, Т.А. Аблова

Ответственный за выпуск: О.С. Капранова

Корректор: О.С. Капранова

Компьютерная верстка: О.С. Капранова

Обработка иллюстраций: Д.В. Сивуров

Подписано в печать 23.10.2013.
Уч.-изд. л. 44,64.
Тираж 105 экз.

Государственное учреждение
«Республиканская научная медицинская библиотека»
ЛИ № 02330/0548510 от 16.06.2009.
ул. Фабрициуса, 28, 220007, г. Минск
Тел./факс +375 (17) 216-23-33
E-mail: med@med.by
http://www.med.by